

REGULATIONSMECHANISMEN DES β -ADRENERG INDUZIERTEN HYPERTROPHEN WACHSTUMS VENTRIKULÄRER HERZMUSKELZELLEN

ROLF SCHRECKENBERG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**REGULATIONSMECHANISMEN DES
A-ADRENERG INDUZIERTEN HYPERTROPHEN
WACHSTUMS VENTRIKULÄRER HERZMUSKELZELLEN**

INAUGURAL-DISSERATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

ROLF SCHRECKENBERG

aus Brilon

Gießen 2006

Aus dem Physiologischen Institut

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. H. M. Piper

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

Tag der Disputation: 21. November 2006

Verzeichnis der Abkürzungen	1
1. Einleitung	3
1.1. Pathophysiologie der Myokardhypertrophie	3
1.2. Untersuchung der Myokardhypertrophie am Zellkulturmodell isolierter ventrikulärer Herzmuskelzellen	6
1.3. Die Proteinkinase C- Familie	7
1.4. Extracellular regulated kinase (ERK)	9
1.5. Der Einfluss α -adrenerger Stimulation auf die Proteinsyntheserate ventrikulärer Kardiomyozyten	10
1.6. Aufgabenstellung	13
2. Material	14
2.1. Chemikalien	14
2.1.1. Vielfach verwendete Chemikalien	14
2.1.2. Chemikalien für L-[^{14}C] Phenylalanin-Assay	16
2.2. PKC-Inhibitoren	16
2.3. Antikörper für Immunoblots	16
2.4. Antisense-Oligonukleotide	16
2.5. Geräte und Laborbedarf	17
2.5.1. Geräte und Gebrauchsgegenstände	17

2.5.1.1. Zellkultur	17
2.5.1.2. L-[¹⁴ C] Phenylalanin-Assay	18
2.5.1.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	18
2.5.1.4. Sonstige Geräte	18
2.5.2. Verbrauchsmaterialien	19
2.6. Auswertung	19
3. Methoden	20
3.1. Isolierung von Herzmuskelzellen	20
3.1.1. Versuchstiere	20
3.1.2. Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten	20
3.2. Zellkultur	23
3.2.1. Vor- und Ausplattieren der Zellkulturschalen	23
3.2.2. Anlegen von Kurzzeitkulturen isolierter Herzmuskelzellen	24
3.2.3. Induktion und Inkubation isolierter Herzmuskelzellen	24
3.2.4. Transfektion der Herzmuskelzellen mit Antisense- Oligonukleotiden	25
3.3. L-[¹⁴C] Phenylalanin-Assay	26
3.3.1. Bestimmung der Proteinsyntheserate	26
3.3.2. Proteinbestimmung	27
3.3.2.1. Probenvorbereitung	27
3.3.2.2. Bestimmung des Proteingehaltes	28
3.4. Gelelektrophoretische Methoden	29
3.4.1. Probenvorbereitung	29
3.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
3.4.3. Western-Blot-Verfahren	32
3.4.4. Immunologische Nachweisverfahren	33

4. Ergebnisse	
4.1. Die Beteiligung verschiedener PKC-Isoformen an der α-adrenerg vermittelten Steigerung der Proteinsynthese	36
4.1.1. Pharmakologische Hemmung der PKC-Isoformen	36
4.1.2. Transfektion der Kardiomyozyten mit Antisense-Oligonukleotiden	40
4.2. Der Einfluss Ca^{2+}-abhängiger PKC-Isoformen auf die ERK-Aktivierung	43
4.3. Einfluss der ERK auf die Proteinsynthese unter α-adrenerger Stimulation	45
5. Diskussion	47
5.1. Hauptbefunde	47
5.2. Ca^{2+}-unabhängige PKC-Isoformen vermitteln die α-adrenerg induzierte Steigerung der Proteinsynthese	48
5.3. Die Partizipation der ERK an der Regulation kardialer Proteinsynthese	50
5.4. Der Einfluss Ca^{2+}-abhängiger PKC-Isoformen auf die ERK-Aktivierung	51
5.5. Die ERK-abhängige Regulation der Phenylephrin-induzierten Steigerung der Proteinsynthese	51
5.6. Schlussfolgerung	53

6. Zusammenfassung	54
7. Summary	55
8. Literaturverzeichnis	56
9. Erklärung	61
10. Danksagung	62
11. Lebenslauf	63

Verzeichnis der Abkürzungen

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
AA/BA	Acrylamid / Bisacrylamid
Ang II	Angiotensin II
AON	Antisense-Oligonukleotide
aqua bidest	aqua bidestillata
AU	arbitrary unit
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
cpm	counts per minute
ERK	extracellular regulated kinase
FCS	Fötales Kälberserum
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethanolsulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
M	mol/l
MAP- Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
min	Minute
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD98059	2-Amino-3-Methoxyflavone
PE	Phenylephrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Aktivität
PKC	Protein-Kinase C
PS	Proteinsynthese
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan

U

unit

vs.

versus

1. Einleitung

1.1. Pathophysiologie der Myokardhypertrophie

Einer der Hauptrisikofaktoren für kardiale Ereignisse wie Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz und plötzlicher Herztod ist die myokardiale Hypertrophie. Bei dieser so genannten Überlastungshypertrophie handelt es sich um strukturelle Anpassungsmechanismen, die entweder auf einer chronischen Druckbelastung im Rahmen eines arteriellen Hypertonus oder einer Volumenbelastung beruhen. Im Falle einer Progredienz der Risikofaktoren kann ein Schwellenwert, das so genannte kritische Herzgewicht (500g), überschritten werden und die Adaptionsmechanismen führen zu einer Leistungsminderung, was klinisch als Herzinsuffizienz imponiert [1].

Der Begriff Hypertrophie beschreibt die Organvergrößerung aufgrund volumetrischer Zunahme der Organzellen. Eine Zunahme der Zellzahl scheidet beim Myokard aus, da es sich um terminal ausdifferenzierte, irreversibel postmitotische Zellen handelt.

Auf subzellulärer Ebene laufen im hypertrophen Gewebe parallel zwei Prozesse ab, die man als anaboles und antikataboles Prinzip bezeichnet. Dies führt einerseits zur Steigerung der Proteinsyntheserate, andererseits zur Verminderung des Energieverbrauchs, da die Zellen vermehrt energiereiche Substrate zum Zweck des Zellwachstums speichern.

Im Frühstadium einer arteriellen Hypertonie reagiert das Myokard aufgrund der vermehrten systolischen Druckbelastung und der damit einhergehenden Erhöhung der Wandspannung mit einer konzentrischen Hypertrophie. Durch diese allseitige Verdickung der Kammerwände ist das Herz in der Lage, die Wandspannung im Normbereich zu halten und so gegen die erhöhte linksventrikuläre Nachlast anzuarbeiten. Diese Adaptionsmechanismen führen über einen gewissen Zeitraum dazu, dass ein normales Herz-Zeit-Volumen aufrechterhalten werden kann.

Die Überfunktion der Myozyten stellt eine chronische subletale Zellschädigung dar, die zum Zweck der Leistungssteigerung die Bildung neuer, parallel angeordneter Myofibrillen

bewirkt. Die so bedingte Dickenzunahme der Ventrikelwände geht jedoch nicht mit einer Änderung des Kammervolumens einher.

Auch bei chronischer Volumenbelastung durch Klappen- oder Shuntvitien versucht das Myokard durch Strukturanpassungen die eingeschränkte Funktion zu kompensieren. In der Füllungsphase wird das Kammervolumen vergrößert und die initiale diastolische Wandspannung erhöht. Dies hat zur Folge, dass sich die Kardiomyozyten durch Synthese neuer Sarkomere verlängern und so Kammerwände und Kammervolumen proportional zunehmen. Durch diese Umbauvorgänge kann der ventrikuläre Füllungsdruck im Normbereich gehalten werden, es entsteht eine exzentrische Hypertrophie.

Wird das kritische Herzgewicht von 500 g durch anhaltende Wachstumsstimuli überschritten, kann es zur Dekompensation der bislang adaptiven Prozesse kommen. Das Koronarsystem ist nicht mehr in der Lage, den Energiebedarf des hypertrophierten Herzens zu decken. Die Leistungsreserven werden schon in Ruhe maximal ausgeschöpft und bei zusätzlicher Belastung kann die Perfusion nicht mehr adäquat gesteigert werden. Das Schlagvolumen fällt unter das notwendige Soll und in der Peripherie entsteht ein Missverhältnis zwischen Blutnachfrage und Blutangebot.

Druckbelastung – Volumenbelastung – myokardiale Hypertrophie

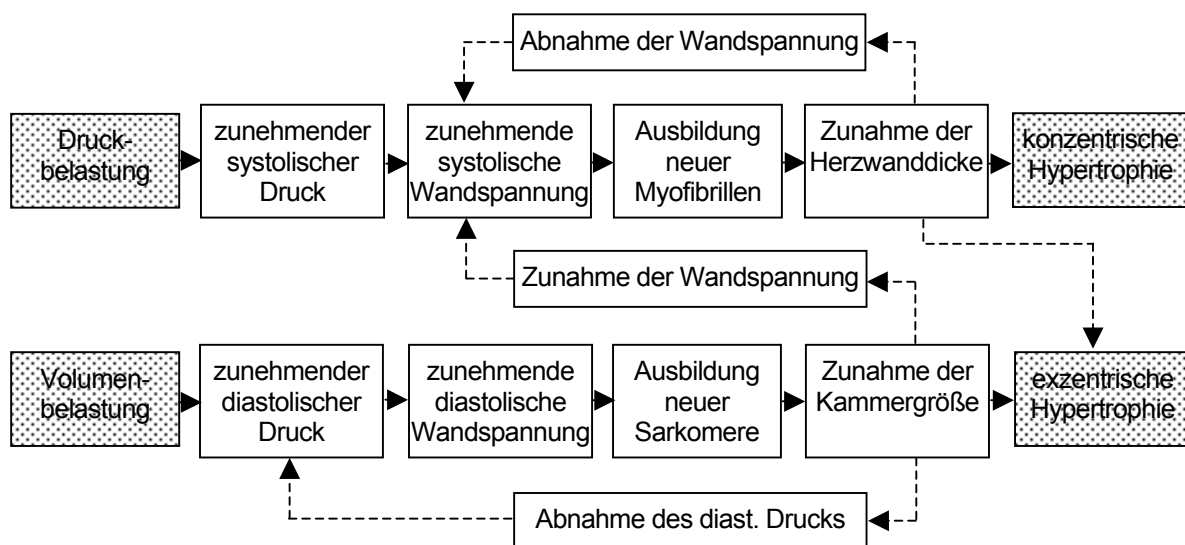


Abb.1.1: Auswirkungen von Druck- und Volumenbelastung auf das Herz [2].

Die mechanischen Belastungen, die zur Hypertrophie des Myokards beitragen, werden begleitet und beeinflusst durch Änderungen im neurohumoralen Milieu. In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl von Botenstoffen identifiziert werden, die zum hypertrophen Wachstum des Herzmuskels beitragen. Daran ist sowohl die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems als auch eine Erhöhung der Sympathikusaktivität beteiligt. Neben Zytokinen und Prostaglandinen beeinflussen auch Hormone wie Insulin oder Thyroxin die Umbauvorgänge am Myokard [3-5].

Eine inadäquate Aktivierung fetaler Wachstumsfaktoren als Antwort auf die Überlastung führt zu einer Steigerung der Proteinsynthese und Expression fetaler Muskelgenprodukte.

Zu den wichtigsten Induktoren einer Myokardhypertrophie zählen die Katecholamine. In vivo wird ein myokardiales Wachstum häufig von erhöhten Plasmaspiegeln an Katecholaminen begleitet [6]. Verschiedene in-vitro-Studien haben gezeigt, dass α -adrenerge Agonisten wie Phenylephrin die Proteinsyntheserate in Kardiomyozyten steigern und die Expression fetaler Genprodukte induzieren. Hierbei spielen die α_1 -adrenergen Rezeptoren gegenüber α_2 - und β -Rezeptoren die dominierende Rolle. Die verschiedenen hypertrophie-induzierenden Botenstoffe unterscheiden sich hinsichtlich ihrer intrazellulären Signaltransduktion und Expression bestimmter Proteine. α_1 -Agonisten begünstigen unter Berücksichtigung der hämodynamischen Faktoren in vivo, hinsichtlich der Synthese- und Expressionsmuster, die Bildung einer druckinduzierten Hypertrophie [7].

1.2. Untersuchung der Myokardhypertrophie am Zellkulturmodell isolierter ventrikulärer Herzmuskelzellen

Die Ergebnisse dieser Studie basieren auf einem Zellkulturmodell isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten, das 1982 von Piper et al. entwickelt wurde [8]. Die Genese einer kardialen Hypertrophie auf molekularer Ebene lässt sich in vivo nur schwer untersuchen. Aus diesem Grund sind in den letzten 15 Jahren verschiedene Kulturmodelle entwickelt worden, die gegenüber der in-vivo Situation wesentliche Vorteile bieten. So kann man durch den Einsatz definierter Medien die Zellantwort direkt auf die Wirkung eines bestimmten Agonisten oder Antagonisten zurückführen. Auch der Einfluss anderer Zelltypen kann durch die reine Myozytenkultur ausgeschlossen werden.

Auf Grund der hohen Komplexität adulte Kardiomyozyten zu isolieren, wird dieses Kulturmodell weitaus seltener genutzt als das der neonatalen Myozyten. Doch gerade bei Fragestellungen, die sich mit der Genese der myokardialen Hypertrophie befassen, bieten adulte Herzmuskelzellen entscheidende Vorteile:

- Die basale Proteinsyntheserate kultivierter adulter Herzmuskelzellen entspricht weitgehend der in-vivo-Syntheserate, bei neonatalen liegt sie um ein Vielfaches höher [9].
- Es bestehen Unterschiede in der Expression verschiedener Proteinisoformen [10].
- Bei adulten Herzmuskelzellen handelt es sich um ausdifferenzierte Zellen, das heißt, es findet keine Proliferation mehr statt wie es noch in der Fötal- oder Neonatalperiode der Fall ist [11,12].

Diese Unterschiede ermöglichen auch unter klinischen Aspekten eine bessere Vergleichbarkeit der Myokardhypertrophie des Erwachsenen mit dem Kulturmodell der adulten Herzmuskelzellen, da es sich in beiden Fällen um terminal differenzierte, postmitotische Zellen handelt.

Es existieren Kulturmodelle adulter Kardiomyozyten, in denen die Zellen mechanisch aktiv bleiben und solche, in denen keine mechanischen Aktionen mehr stattfinden. Da in dieser Arbeit der wachstumsstimulierende α -adrenerge Effekt, unabhängig von mechanischen Einflüssen, auf die Proteinsynthese untersucht wird, kommt ein Kulturmodell mechanisch inaktiver Kardiomyozyten zum Tragen.

1.3. Die Proteinkinase C- Familie

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle der Proteinkinase C-Isoformen hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Proteinbiosynthese in ventrikulären Myozyten näher zu charakterisieren. Bei den Proteinkinasen der PKC-Familie handelt es sich um so genannte Serin/Threoninkinasen, die als ubiquitär vorkommende Proteine für viele Signaltransduktionsprozesse essentiell sind. Von besonderem Interesse ist die Beteiligung dieses Enzyms an Wachstums- und Differenzierungsprozessen, über deren genaue Abläufe noch immer Unklarheit herrscht [13].

Derzeit sind mindestens 12 Isoformen der Proteinkinase C beschrieben worden, die sich in ihrer Aminosäuresequenz und ihren Regulationsmechanismen unterscheiden. Aufgrund dieser Unterschiede werden sie in vier Subfamilien zusammengefasst:

<u>Subfamilien:</u>	<u>Isoformen:</u>	<u>Aktivatoren:</u>	<u>Cofaktor Ca^{2+}:</u>
classical PKCs	α , β I, β II, γ	DAG, PMA	Ca^{2+} -abhängig
novel PKCs	δ , ϵ , θ , η	DAG, PMA	Ca^{2+} -unabhängig
eccentric PKCs	μ	?	Ca^{2+} -unabhängig
atypical PKCs	ζ , ι , λ	PIP_3 (indirekt)	Ca^{2+} -unabhängig

Die Aktivierung der PKC kann sowohl über Tyrosinkinaserzeptoren als auch über G-Proteingekoppelte Rezeptoren erfolgen. Gemeinsamer Ausgangspunkt des Signalweges ist die Aktivierung einer Phospholipase C. Dieses Enzym ist für die Bereitstellung des wichtigsten Aktivators der PKC, des Diacylglycerols (DAG), verantwortlich. Durch Spaltung eines spezifischen Membranphospholipids, des Phosphatidylinositols (PIP_2), entstehen als Reaktionsprodukte das DAG und das Inositoltriphosphat (InsP_3). Während das DAG lokal in der Plasmamembran verbleibt, ist der lösliche second messenger InsP_3 für eine transiente Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration verantwortlich. Für die klassischen PKC-Isoformen stellt Calcium einen wichtigen Cofaktor dar, der die Translokation des Enzyms an die Plasmamembran fördert und somit die Aktivierung des Enzyms unterstützt.

Der allgemeine Aufbau aller Isoenzyme besteht aus einer N-terminal regulatorischen und einer C-terminal katalytischen Einheit. Die regulatorische Einheit enthält zwei Domänen, an der sowohl DAG, als auch Ca^{2+} die Aktivität der PKC beeinflussen können. Zusätzlich befindet sich weiter N-terminal gelegen eine Pseudosubstratdomäne, die im Ruhezustand die gegenüberliegende katalytische Region besetzt und somit die Umsetzung eines spezifischen Substrats verhindert. Nach Aktivierung durch DAG löst sich die Bindung des Pseudosubstrats und das spezifische Substrat kann andocken [14].

Aufbau und Regulationsmechanismen der PKC

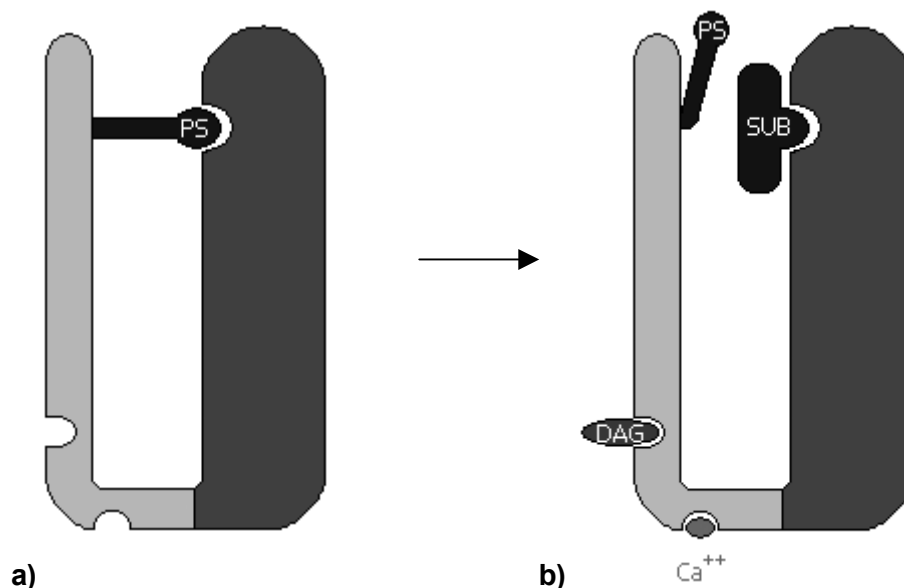


Abb.1.2: Schematischer Aufbau der Proteinkinase C. a) inaktives Enzym, b) aktives Enzym. Diacylglycerin (DAG), Pseudosubstrat (PS), Substrat (SUB) [15].

Ventrikuläre Kardiomyozyten exprimieren Mitglieder aus drei Subfamilien: zwei bzw. drei c- (classical) Isoformen (PKC- α , PKC- β I und β II), zwei n- (novel) Isoformen (PKC- δ und PKC- ϵ), und zwei atypische (PKC- ζ und PKC- λ) [16-19]. Zur Klärung der Frage, welche PKC-Isoformen an der Phenylephrin induzierten Steigerung der Proteinsyntheserate beteiligt sind, werden in dieser Arbeit die zwei Ca^{2+} -abhängigen Isoformen α und β und die zwei Ca^{2+} -unabhängigen Isoformen δ und ϵ untersucht.

1.4. Extracellular regulated kinase (ERK)

An der Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie als Antwort auf eine akute Druckbelastung sind verschiedene Typen G-Proteingekoppelter Rezeptoren beteiligt. An diese Rezeptoren schließen sich intrazelluläre Signalübertragungswege an, die, abhängig vom jeweiligen Stimulus, erhebliche Unterschiede aufweisen. So erfolgt ein Angiotensin II induzierter Anstieg der Proteinsyntheserate ERK-abhängig, während die α -adrenerge Stimulation zwar eine starke Aktivierung der ERK herbeiführt, diese jedoch keinen Einfluss auf die Proteinsynthese hat [20].

Die ERK gehört zur Familie der Serin/Threonin-Protein-Kinasen. Als so genannte mitogen-aktivierte Protein- (MAP) Kinasen übernehmen sie wichtige Funktionen in der Übertragung extrazellulärer Stimuli in den Zellkern, wo sie durch Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren an der Steuerung der Zellproliferation, der Differenzierung und der Apoptose beteiligt sind. Aufgrund verschiedener Signalübertragungswege können drei Subfamilien von MAP-Kinasen unterschieden werden: ERK 1/2, JNK und p38. Über eine dreistufige streng hierarchisch angeordnete Signalkaskade erfolgt die Aktivierung der MAP-Kinase über Phosphorylierung und Aktivierung durch eine MAP-Kinase Kinase, die ihrerseits von einer MAP-Kinase Kinase Kinase phosphoryliert und aktiviert wird [21-23]. Das initiale Ereignis zur Aktivierung dieser Enzymkaskade ist eine Raf-Kinase, die ihrerseits durch ein als Ras bezeichnetes G-Protein aktiviert wird. JNK und p38 werden vorwiegend durch Stressfaktoren wie UV-Licht und osmotischen Stress oder inflammatorische Cytokine aktiviert. Die ERK 1/2, auch bekannt als p42/44 Map-Kinase, wird über mitogene Faktoren aktiviert und ist an der Zellreifung und Zellproliferation beteiligt. Die ERK war die erste der MAP-Kinasen, der man in Kardiomyozyten eine Beteiligung an hypertrophen Wachstumsprozessen zugeschrieben hat. Hierbei spielen sowohl mechanischer Stress als auch verschiedene neurohumorale Stimuli die größte Rolle [24,25].

In dieser Studie soll unter α -adrenerger Stimulation die Beteiligung der ERK an hypertrophen Wachstumsprozessen in Kardiomyozyten detaillierter untersucht werden. Zu diesem Zweck wird in einer Versuchsreihe der hochspezifische MAP-Kinase Kinase Inhibitor PD98059 eingesetzt. Die gewählte Konzentration basiert auf Konzentrations-

Wirkungs-Kurven, die am selben Zellkulturmodell in früheren Arbeiten ermittelt wurden [20].

Ablauf der ERK 1/2 Signalkaskade

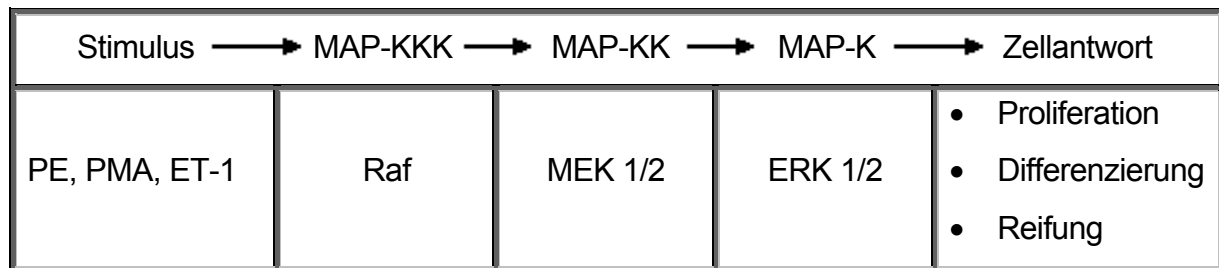


Abb.1.3: Schematische Übersicht der ERK 1/2 - Aktivierung durch hypertrophe Stimuli.

1.5. Der Einfluss α -adrenerger Stimulation auf die Proteinsyntheserate ventrikulärer Kardiomyozyten

Für die hormonelle Signaltransduktion stehen verschiedene Mechanismen zu Verfügung, von denen die Guaninnukleotid-bindenden Proteine, die so genannten G-Proteine, eine wichtige Rolle spielen. Während der Ausbildung einer myokardialen Hypertrophie tragen Veränderungen im neurohumoralen Milieu entscheidend zum Anstieg der Proteinsyntheserate bei. An diesem Prozess sind die so genannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren beteiligt. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt jedoch abhängig von der jeweiligen Isoform hinsichtlich der myokardialen Umbauvorgänge zu unterschiedlichen Synthese- und Expressionsmustern. Zwei Mitglieder dieser Rezeptorfamilie, die unter pathophysiologisch veränderten hämodynamischen Bedingungen zum hypertrophen Wachstum des Myokards beitragen, sind der α_1 -adrenerge Rezeptor und der Angiotensin II Typ1 (AT1) Rezeptor. Die sich hieran anschließenden Signalkaskaden führen nach Aktivierung einer Phospholipase C über unterschiedliche Mechanismen zur Steigerung der Proteinsyntheserate.

Obgleich die hypertrophen Stimuli beider Rezeptoren in der Lage sind, Enzyme wie die PKC, die ERK2, die PI3-Kinase und die p70S⁶-kinase zu aktivieren, bestehen erhebliche Unterschiede in der Präferenz der Isoformen, der Dauer und der Reihenfolge ihrer Aktivierung.

Die α -adrenerge Stimulation stellt einen der stärksten Mechanismen zur Steigerung der Proteinsynthese in ventrikulären Herzmuskelzellen dar. Vermittelt wird dies über den α_{1A} -Adrenoceptor, der in dieser Studie durch Phenylephrin in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ stimuliert wird. Über einen Zeitraum von 24 h kann so an isolierten Kardiomyozyten eine Steigerung der Proteinsyntheserate von 53 % erreicht werden. Die Steigerung der Proteinsynthese setzt eine Aktivierung der Proteinkinase C voraus. Über eine Stimulaton der α -Adrenozeptoren wird ein breites Spektrum an PKC-Isoformen aktiviert. Es herrscht jedoch noch immer Unklarheit darüber, welche Isoformen (Ca^{2+} -abhängige / Ca^{2+} -unabhängige) für das hypertrophe Wachstum in Kardiomyozyten verantwortlich sind. Nachfolgend ist die Aktivierung der PI3-Kinase und der p70S⁶-Kinase für die Steigerung der Proteinsynthese verantwortlich. Die durch α -adrenerge Stimulation ausgelöste schnelle, aber nur transiente ERK2-Aktivierung ist ebenfalls PKC-abhängig, trägt jedoch nicht zum hypertrophen Wachstum adulter Kardiomyozyten bei [20,26-28].

Signaltransduktion unter α -adrenerger Stimulation

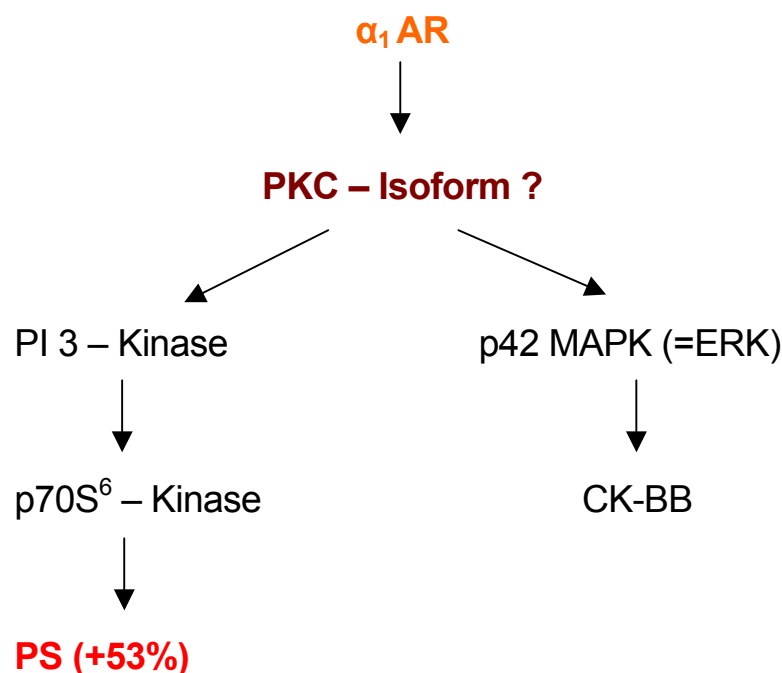


Abb.1.4: Aktivierung der PKC mit nachfolgender Zunahme der Proteinsynthese.

Im Gegensatz hierzu stellt Angiotensin II einen weit weniger potenten hypertrophen Stimulus dar, der die Proteinsyntheserate um bis zu 23 % steigern kann. Über die PI3-Kinase, die hier der PKC vorgeschaltet ist, werden hauptsächlich die Ca^{2+} -unabhängigen Isoformen aktiviert, die ihrerseits über eine verzögerte, jedoch konstitutive Aktivierung der ERK2 zur Proteinsynthesesteigerung führen. Diese lang anhaltende Aktivierung der ERK2 ist wahrscheinlich die Vorbedingung für eine Kopplung an die p70S⁶-Kinase, durch deren Aktivierung die Proteinsynthese gesteigert wird [29-32].

Signaltransduktion nach Stimulation mit Angiotensin II

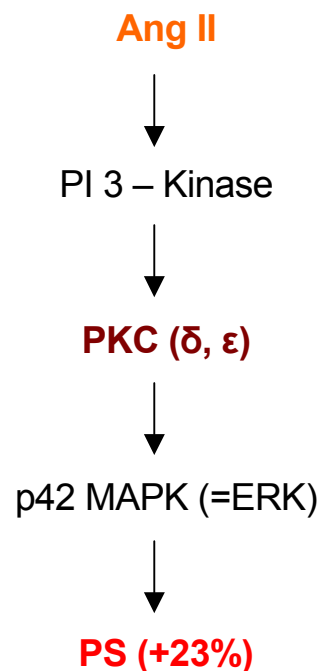


Abb.1.4: Steigerung der Proteinsyntheserate durch Angiotensin II.

Ein direkter Vergleich dieser Systeme macht die spezifischen Unterschiede der beiden Liganden deutlich, die sich initial sehr ähnlicher second messenger Systeme bedienen. In diesem Zusammenhang kommt möglicherweise der PKC bzw. der spezifischen Aktivierung ihrer Isoformen eine Schlüsselposition zu. Im Gegensatz zu Angiotensin II findet nach α -adrenerger Stimulation eine Co-Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Isoformen statt. Dies könnte nicht nur einen entscheidenden Einfluss auf die unterschiedliche Aktivierung der ERK2 haben, sondern auch im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Regulationsmechanismen hinsichtlich der Proteinsynthese stehen.

1.6. Aufgabenstellung

Die in Kapitel 1.5. gegenübergestellten Signaltransduktionswege zweier Liganden, die initial sehr ähnliche Rezeptor- und Enzymsysteme aktivieren, gaben Anlass, die Zusammenhänge zwischen der spezifischen Aktivierung einzelner PKC-Isoformen hinsichtlich der ERK2-Aktivierung und des hypertrophen Wachstums der Kardiomyozyten detaillierter zu untersuchen.

- 1) In einer ersten Versuchsreihe wurden sechs PKC-Inhibitoren mit unterschiedlicher Isoformspezifität eingesetzt und ihr Einfluss auf die Proteinsynthese unter α -adrenerger Stimulation untersucht. Für jeden Inhibitor wurden individuelle Konzentrations-Wirkungs-Kurven ermittelt.
- 2) Zur Verifikation der Daten aus der ersten Versuchsreihe wurden die Kardiomyozyten mit Antisense-Oligonukleotiden transfiziert. Durch die eingesetzten Antisense-Oligonukleotide gegen die PKC-Isoformen α , δ und ϵ konnte deren Expression selektiv gestört werden.
- 3) In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Auswirkungen einer pharmakologischen Hemmung der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen auf die Dauer der ERK2-Aktivierung unter α -adrenerger Stimulation untersucht.
- 4) Aufgrund der zuvor gewonnenen Erkenntnisse konnte nun ein Zusammenhang zwischen ERK2-Aktivierung und Steigerung der Proteinsynthese unter α -adrenerger Stimulation aufgezeigt werden.

2. Material

2.1. Chemikalien

2.1.1. Vielfach verwendete Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Albumin (aus Rinderserum)	Sigma, Taufkirchen
BCIP	Calbiochem, Schwalbach i. T.
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, Taufkirchen
Collagenase; Typ CLSII, (322U/mg)	Biochrom, Berlin
Cytosin- β -arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
Diethylaether	Roth, Karlsruhe
DTT	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
FCS	Invitrogen, Karlsruhe
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Medium 199/Earl' s Salts	Biochrom, Berlin
Mercaptopropanol	Merck-Suchard, Hohenbrunn

Methanol	Riedel de Haen, Seelze
Molekulargewichtsmarker	Fluka, Seelze
Naphthylethylenediamine	Sigma, Taufkirchen
NBT	Roche, Mannheim
NCS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
PD98059	Calbiochem, Schwalbach i. T.
Phenylephrin	Sigma, Taufkirchen
SDS	Merck, Darmstadt
Temed	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Vanadat	Merck, Darmstadt

2.1.2. Chemikalien für L-[¹⁴C] Phenylalanin-Assay

L-[¹⁴ C] Phenylalanine (3x10 ³ Bq/ml)	Merck, Darmstadt
LSC-Cocktail (Ultima Gold®)	Invitrogen, Karlsruhe

2.2. PKC-Inhibitoren

Gö6850 (Bisindolylmaleimide I)	Calbiochem, Schwalbach i. T.
Gö6976	Calbiochem, Schwalbach i. T.
Gö6983	Calbiochem, Schwalbach i. T.
HBDDE	Calbiochem, Schwalbach i. T.
Rottlerin	Calbiochem, Schwalbach i. T.
Ro32-0432	Calbiochem, Schwalbach i. T.

2.3. Antikörper für Immunoblots

anti-rat p42 map-Kinase	Santa Cruz Biotechnology
anti-PKC-alpha (lot K2085 SA-144)	Biomol, Karlsruhe
anti-PKC-delta (lot K1962 SA-148)	Biomol, Karlsruhe
anti-PKC-epsilon (lot K2087 SA-149)	Biomol, Karlsruhe
anti-mouse IgG	Sigma, Taufkirchen
anti-rabbit IgG	Sigma, Taufkirchen

2.4. Antisense- Oligonukleotide

PKC-alpha (5'- GAT AAC GTC AGC CAT -3')	Invitrogen, Karlsruhe
PKC-delta (5'- CCA GGA AGG GTG CCA TG -3')	Invitrogen, Karlsruhe
PKC-epsilon (5'- ATT GAA CAC TAC CAT -3')	Invitrogen, Karlsruhe

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Calbiochem (Bad Soden), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze) und Sigma (Taufkirchen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.5. Geräte und Laborbedarf

2.5.1. Geräte und Gebrauchsgegenstände

2.5.1.1. Zellkultur

Bauchdeckenschere (gebogen, 160 mm)	Aesculap, Tuttlingen
Präparierschere groß (170 mm)	Aesculap, Tuttlingen
Präparierschere klein	Aesculap, Tuttlingen
Kaselpinzette	Eickemeyer, Tuttlingen
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Physiologisches Institut, Universität Gießen
Tissue Chopper	HSE, March-Hugstetten
Nylonnetz (Polyamid, 200 µm)	NeoLab, Heidelberg
Zentrifuge (Megafuge 2.0)	Kendro, Hanau
Sterilbank	Kendro, Hanau
Brutschrank	Kendro, Hanau
Mikroskop TMS-F	Nikon, Japan
50 ml Röhrchen	Typ: Falcon 2070 Becton Dickinson, Heidelberg
Kulturschalen	Typ: Falcon 3001, 3004 Becton Dickinson, Heidelberg

2.5.1.2. L-[¹⁴C] Phenylalanin-Assay

Flüssig-Szintillationszähler	Canberra-Packard, Frankfurt/Main
Szintillationsgefäße	Canberra-Packard, Frankfurt/Main
Mikrotiterplatten-Photometer	Dynatech, Denkendorf
Mikrotiterplatten	Dynatech, Denkendorf

2.5.1.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Elektrophorese-Netzgerät	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Vertikale Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen
PVDF-Blotmembran	Millipore, Eschborn
Filterpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen

2.5.1.4. Sonstige Geräte

Brutschrank	Typ: Cytoperm Kendro, Hanau
Digitale Analysenwaage	Mettler Toledo, Gießen
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizblock	IKA, Staufen
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Kolbenhub-Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Schüttler	Typ: WT 12 Biometra, Göttingen
Sterilbank	Typ: Lamin Air® HBB 2472
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

Wasserdemineralisierungsanlage
Zentrifugen

Millipore, Eschborn
Kendro, Hanau

2.5.2. Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen
Reaktionsgefäße
Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)
Einweg-Zellschaber

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sartorius, Göttingen
Typ: Falcon 3087
Becton Dickinson, Heidelberg

2.6. Auswertung

Flachbettscanner

Typ: Scan jet 4c
Hewlett Packard, Eschborn

Software

Image-Quant[®] Molecular Dynamics,
Krefeld
Microsoft[®] Excel
GraphPad Prism 3.0

Statistische Tests

Varianzanalyse
Student-Newman-Keuls-Test

3. Methoden

3.1. Isolierung von Herzmuskelzellen

3.1.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden Kardiomyozyten aus 200 – 250 g schweren und ca. 3 Monate alten, männlichen Wistar-Ratten isoliert. Die Tiere stammen aus der Zucht des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen. Im Tierstall war der freie Zugang zu Wasser und fester Nahrung (Standardfuttermittel Altromin®) jederzeit gewährleistet. Die Haltung der Tiere entspricht der “Guide for Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication No.85-23).

3.1.2. Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten

Grundlage der Versuche bilden Kurzzeitkulturen frisch isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten. Die im Folgenden beschriebene Methode der Zellisolation wurde entwickelt und charakterisiert von Piper et al. (1982) [8].

Die Inbetriebnahme der Langendorff – Perfusionsanlage gehört zu den wichtigsten vorbereitenden Maßnahmen. Das zirkulierende Wasser in den Glasmänteln muss auf eine Temperatur von 37°C aufgeheizt werden. Der für die Perfusion vorhandene Kreislauf wird mit aqua bidest und anschließend mit Powell-Medium gespült. Es folgt das Befüllen der Anlage mit 80 ml Powell-Medium, das blasenfrei zirkulieren muss und während der gesamten Versuchsdauer mit Carbogen begast wird. Beträgt die Temperatur des Powell-Mediums im Perfusionskreislauf ebenfalls 37°C, kann mit der Präparation begonnen werden.

Zusammensetzung des Powell-Mediums:

NaCl	110 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
Mg ₂ SO ₄	1,2 mmol/l
NaHCO ₃	25 mmol/l
Glukose	11 mmol/l

Die Versuchstiere werden für ca. 1-2 min mit Diethylether narkotisiert und anschließend durch Nackenschlag getötet. Über eine dorsolaterale Thorakotomie wird der Brustkorb weiträumig eröffnet und das gesamte Herz-Lungen-Paket vorsichtig exzidiert. In einer Petrischale mit 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung werden Blut- und Gewebereste entfernt, die Lungen direkt am Hauptbronchus abgetrennt und anschließend die Trachea zusammen mit dem Ösophagus abpräpariert. Die Aorta wird möglichst distal mit der Pinzette gefasst und kurz hinter dem Abgang des Truncus anonymus durchtrennt.

Das Herz wird nun über den Aortenstumpf an dem PE-Konus der Langendorff-Anlage retrograd perfundiert. Mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. 1 Tropfen pro s werden die Koronarien und die Herzkammern mit 40 ml Powell-Medium gespült. Anschließend wird der Perfusionskreislauf geschlossen, 10 ml einer Collagenase-Stammlösung (s.u.) infundiert und für ca. 25 min rezirkulierend perfundiert. Über eine Peristaltikpumpe wird eine Flussrate von 1,5 ml pro min aufrechterhalten.

Collagenase-Stammlösung:

Collagenase	20 mg (chargenabhängig kann die Masse differieren)
Powell-Medium	10 ml
CaCl ₂ (100 mmol/l)	12,5 µl

Nach der Enzymperfusion wird das Herz in eine Petrischale überführt, mit einem Skalpell von Vorhöfen, großen Gefäßen und Bindegewebe freipräpariert und in ca. 5 mm große Stücke zerschnitten. Es folgt die zweimalige mechanische Zerkleinerung des Gewebes mit dem Tissue Chopper (Schnittbreite: 0,7 mm).

Für den jetzt folgenden Nachverdau wird der Zellbrei in ein mit 30 ml Perfusionsmedium gefülltes Teflongefäß überführt. Während des zehnminütigen Vorganges wird unter permanenter Carbogenbegasung durch kontinuierliches Auf- und Abpipettieren der Suspension eine zunehmende Auflösung des Gewebeverbundes erreicht.

Nach Beendigung des Nachverdaus wird die Zellsuspension durch eine Nylongaze (Porengröße 200 µm) filtriert und anschließend 3 min lang bei 400 U/min zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich Gewebetrümmer und Zelldetritus befinden, wird vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Powell-Medium mit einem CaCl_2 -Anteil von 200 µmol/l aufgenommen. Diese Suspension wird für 2 min bei 400 U/min zentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wird erneut in Powell-Medium mit einem CaCl_2 -Anteil von 400 µmol/l aufgenommen und zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt. Diese wird gleichmäßig in vorbereitete Reagenzgläser, die zu 2/3 mit Powell-Medium befüllt wurden, dekantiert. Die Reagenzgläser werden für 1 min bei 300 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in CCT-Kulturmedium aufgenommen. Durch dieses Protokoll werden die Zellen sukzessiv in Puffer mit physiologischer Kalziumkonzentration überführt und durch Sedimentation von abgerundeten Zellen separiert. Die so gewonnene Zellpopulation besteht zu 70 – 80% aus intakten, kalziumtoleranten und stäbchenförmigen Kardiomyozyten.

Albumingradient:

Powell-Medium	50 ml
BSA	2 g
CaCl_2 (100 mmol/l)	500 µl

3.2. Zellkultur

3.2.1. Vor- und Ausplattieren der Zellkulturschalen

Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen und Nährmedien erfolgen unter sterilen Bedingungen. Um zu gewährleisten, dass sich eine große Zahl der Kardiomyozyten auf den Böden der Kulturschalen anheftet, werden diese über Nacht im Brutschrank bei 37°C mit Vorinkubationsmedium beschichtet. Kurz bevor die Kardiomyozyten ausplattiert werden, wird dieses Medium abgesaugt.

M199/HEPES gepuffert:

Medium 199/Earl's Salts	9,8 g/l
HEPES	15 mmol/l

Auf pH 7,4 titriert und sterilfiltriert.

Vorinkubationsmedium:

M199/HEPES gepuffert	x ml
FCS	4 % (vol/vol)
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Das bei der Präparation gewonnene Zellpellet wird vorsichtig in 37°C warmem CCT-Medium gelöst. Hierbei wird die Zellausbeute eines Herzens in ca. 25 ml des Mediums aufgenommen. Die homogene Suspension wird gleichmäßig auf die Kulturschalen verteilt. In CO₂-freier Atmosphäre werden die Zellen bei 37°C im Brutschrank für ca. 4 h inkubiert und anschließend zweimal mit CCT-Medium gewaschen. So werden runde und nicht haftende Zellen entfernt. Zur Prävention von Zellwachstum nicht-myozytärer Genese wird dem Kulturmedium 10 µmol/l Cytosin-β-Arabinofuranosid hinzugesetzt.

CCT-Kulturmedium:

M199/HEPES gepuffert	x ml
Creatin	5 mmol/l
Carnitin	2 mmol/l
Taurin	5 mmol/l
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Cytosin-β-Arabinofuranosid	10 µmol/l
Auf pH 7,4 titriert und sterilfiltriert.	

3.2.2. Anlegen von Kurzzeitkulturen isolierter Herzmuskelzellen

In dieser Studie werden frisch isolierte Kardiomyozyten verwendet, die für maximal 48 h unter serumfreien Bedingungen kultiviert werden. Nach den Waschvorgängen können die Zellen entsprechend den Versuchsprotokollen induziert und für unterschiedliche Zeitperioden inkubiert werden.

3.2.3. Induktion und Inkubation isolierter Herzmuskelzellen

Für die α-adrenerge Stimulation der Zellen wird das direkte Sympathomimetikum Phenylephrin in einer Konzentration von 10 µmol/l eingesetzt. Die gewählte Konzentration basiert auf Konzentrations-Wirkungs-Kurven früherer, bereits publizierter Studien [28].

Zur pharmakologischen Hemmung der PKC oder der ERK wurden die Kardiomyozyten mit dem jeweiligen Inhibitor für ca. 15 min vorinkubiert, bevor sie mit dem α-Agonisten Phenylephrin inkubiert werden.

3.2.4. Transfektion der Herzmuskelzellen mit Antisense-Oligonukleotiden

Zur Verifikation von Daten, die mit pharmakologischen Inhibitoren generiert werden, erfolgt eine selektive Down-Regulation einzelner Enzym-Isoformen mit Antisense-Oligonukleotiden. Durch die spezifische Bindung des Antisense-Oligonukleotides an die komplementäre Sequenz der RNA des Zielproteins wird letztlich die Bildung dieses Proteins verhindert (siehe Abb.3.1). Damit eine ausreichende Stabilität der Oligonukleotide gewährleistet ist, werden ausschließlich so genannte phosphorthioat-modifizierte Nukleotide verwendet. Die Zellen werden über 24 h mit 10 µg/ml Antisense-Oligonukleotiden transfiziert. Für die Untersuchung hypertropher Wachstumsmechanismen erfolgt anschließend für weitere 24 h die Stimulation mit PE.

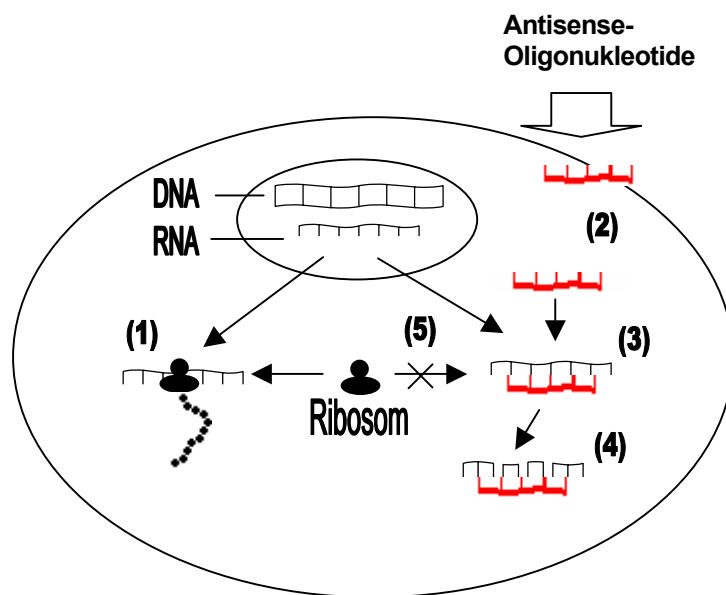


Abb.3.1: Wirkmechanismus von Antisense-Oligonukleotiden.

(1) unter physiologischen Bedingungen binden Ribosomen an die mRNA, (2) Antisense-Oligonukleotide werden von der Zelle aufgenommen, (3) Bildung eines Doppelstranges aus mRNA und dem Oligonukleotid (Heteroduplex), (4) zelleigene Enzyme bauen den Heteroduplex ab, (5) an den Heteroduplex können die Ribosomen nicht mehr binden.

3.3. L-[¹⁴C]- Phenylalanin-Assay

3.3.1. Bestimmung der Proteinsyntheserate

Zur Bestimmung der Proteinsyntheserate als Parameter für die Hypertrophieentwicklung der Herzmuskelzellen kommt in dieser Studie das Äquilibriumsverfahren zur Anwendung. Bei diesem Verfahren werden die Zellen über 24 h der radioaktiv markierten Aminosäure Phenylalanin ausgesetzt. L-[¹⁴C] Phenylalanin eignet sich deshalb als Indikator, weil es nach Aufnahme in die Zellen nicht modifiziert wird und sich deshalb ausschließlich in der Proteinfraction wiederfindet. Zusätzlich zu 10 µmol/l L-[¹⁴C] Phenylalanin wird dem Medium nicht-radioaktiv markiertes Phenylalanin in einer Konzentration von 0,3 mmol/l beigelegt. Mit diesen Parametern ist gewährleistet, dass die Verfügbarkeit der radioaktiv markierten Aminosäure unter allen experimentellen Bedingungen konstant ist, die korrespondierende t-RNA vollständig abgesättigt wird und Unterschiede der spezifischen Aktivität in den einzelnen Kulturschalen minimiert werden.

Nach Beendigung der Inkubation wird das radioaktive Medium von den Kulturschalen abgesaugt und die Zellen dreimal mit eiskalter phosphatgepufferter salinen Lösung (PBS) gewaschen. Anschließend wird die Proteinfraction durch Zugabe 10 %iger Trichloressigsäure über Nacht bei 4°C gefällt [33].

PBS-Lösung:

NaCl ₂	137 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,5 mmol/l
Na ₂ HPO ₄	1,0 mmol/l
KCl	2,7 mmol/l

0,5 ml des Überstandes, in dem sich nicht-gefällte Bestandteile, wie die L-[¹⁴C] Phenylalanin beladene t-RNA, befinden, werden in 4 ml Universal LSC-Cocktail überführt und im Flüssig-Szintillationszähler ausgewertet. Diese Fraction repräsentiert den so genannten Precursorpool.

Der restliche Überstand wird verworfen, die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen und die ausgefallenen Proteine mit 1N NaOH-0.01 % (wt/vol)-SDS für 2 h im Brutschrank resuspendiert. Aus diesen Proben wird einerseits das in die Proteine eingebaute L-[¹⁴C] Phenylalanin bestimmt und zusätzlich zur Normierung der Proteingehalt nach Bradford ermittelt.

Ergebnisse früherer Studien zeigen, dass der Precursorpool sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter experimentellen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede aufweist. Der Einbau des L-[¹⁴C] Phenylalanin in die Proteinfraction hängt jedoch vom jeweiligen Wachstumsstimulus ab.

Die Proteinsyntheserate lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Proteinsyntheserate} = \frac{\text{cpm}_{\text{ink}}}{\text{cpm}_{\text{pre}} \times 24 \text{ h}}$$

cpm_{ink} = Einbau von L-[¹⁴C] Phenylalanin in die Proteinfraction

cpm_{pre} = an t-RNA gebundene L-[¹⁴C] Phenylalanin = Precursorpool

3.3.2. Proteinbestimmung

3.3.2.1. Probenvorbereitung

Der Proteingehalt der Kardiomyozyten zählt ebenfalls zu den hypertrophierelevanten Parametern. Das unter 3.3.1. beschriebene Protokoll erlaubt eine parallele Bestimmung des Gesamt-Proteingehalts direkt aus den Proben im Anschluss an die Resuspension der gefällten Proteine mit 1N NaOH-0.01 % (wt/vol)-SDS.

3.3.2.2. Bestimmung des Proteingehaltes

Für die Quantifizierung der Proteine wird die photometrische Methode nach Bradford verwendet. Das Messverfahren bietet sowohl durch seine Unempfindlichkeit gegenüber störenden Ionen und Reduktionsmitteln als auch durch sein monochromatisches Messprinzip wesentliche Vorteile im Vergleich zu anderen Verfahren. Durch die Bindung des Coomassie Brilliant Blue-Farbstoffes an Proteine entstehen Komplexe, die das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschieben. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist hierbei ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

10 µl des in 3.3.2.1 beschriebenen Zellhydrolysats werden auf Mikrotiterplatten mit jeweils 200 µl Bradford-Reagenz gemischt und anschließend photometrisch die Extinktion gemessen. Da die Farbreaktion je nach Proteinzusammensetzung unterschiedlich ausfällt, benötigt man zur exakten Quantifizierung des Proteingehaltes eine Eichlösung. Hierzu wird BSA in den Konzentrationen 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 mg/ml in 1N NaOH/0,01% (wt/vol) SDS gelöst.

Bradford-Reagenz:

Coomassie Brilliant Blue G 250	0,1% (wt/vol)
Methanol, 96%ig	5% (vol/vol)
ortho-Phosphorsäure, 85%ig	10% (vol/vol)
aqua bidest	ad 1 l

3.4. Gelelektrophoretische Methoden

3.4.1. Probenvorbereitung

Proteine können nach der Behandlung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und Mercaptopropandiol in der Gel-Elektrophorese ihrer Molekülgröße nach aufgetrennt werden. Die Zellen werden hierzu mit kalter PBS-Lösung gewaschen und anschließend mit 100 µl Lysis-Puffer versetzt. Das im Puffer enthaltene SDS und das abschließende Erhitzen der Proben auf 95°C spaltet die Tertiär- und Sekundärstrukturen auf und führt zu Streckung der Moleküle. Die Schwefelbrücken zwischen Cysteinen werden durch das reduzierende Mercaptoethanol aufgespalten, die Nukleinsäuren werden durch Zugabe von Benzonase (50 U/ml) verdaut, und durch Natriumvanadat wird die Aktivität der Protein-Thyrosin-Phosphatasen gehemmt. Im Anschluss an die 20 min Lyse werden die Zellen mit dem Zellschaber geerntet, mit 50 µl Laemmli-Puffer versetzt und abschließend für 5 min auf 95°C erhitzt [34].

Lysispuffer :

Tris/HCl	50 mmol/l
SDS	2 % (w/v)
Natriumvanadat (1 mM)	10 % (v/v)
Mercaptoethanol	10 % (v/v)
pH 6,7	

Laemmli-Puffer:

Tris/HCl	500 mmol/l
Glycerin	25 % (v/v)
SDS (10%ig)	4 % (w/v)
Mercaptopropandiol	1 % (v/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
pH 6,8	

3.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird auf das diskontinuierliche System nach Laemmli (1970) zurückgegriffen. Die Diskontinuität beschreibt die biphasische Gelstruktur, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel. Es bestehen Unterschiede im pH-Wert und der Konzentration des Acrylamids.

Zwischen zwei Glasplatten (150 x 150 mm) wird zunächst das 1,5 mm starke Trenngel gegossen, das ca. 2/3 der Gesamtlaufstrecke ausmacht. Unter Sauerstoffabschluss lässt man das Gel für ca. 25 min polymerisieren. Anschließend wird das Sammelgel gegossen, in das mit Hilfe eines Profilformers Taschen zur Probenaufgabe integriert werden. Nach weiteren 30 min ist das Sammelgel ebenfalls polymerisiert und einsatzbereit.

Bei den eingesetzten Polyacrylamidgelen mit einem SDS-Anteil von 0,2 % erhält man Bereiche, die eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungstrecken der Proteine zeigen. Mit Hilfe eines Standards (Spektrum: 250 kD – 10 kD) lassen sich die Molekulargewichte der Proteine ermitteln.

Aufgrund der hohen Auflösung, die mit der diskontinuierlichen Elektrophorese erreicht wird, lässt sich die p42 MAP-Kinase auf einem Gel in die aktivierte (phosphorylierte) und nicht-aktivierte (dephosphorylierte) Form trennen. Für diese Versuchsreihe wird ein 12,5 %iges Trenngel mit einem Verhältnis AA:BA von 100:1 verwendet. Versuche, in denen die PKC-Isoformen detektiert werden, benötigen lediglich ein 10 %iges Trenngel mit einem Verhältnis AA:BA von 30:1.

<u>Trenngel:</u>	<u>10 %:</u>	<u>12,5 %:</u>
AA/BA	10 ml (30:1)	12,5 ml (100:1)
Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml
aqua bidest	12,5 ml	10,0 ml
APS 10% (wt/vol)	200 µl	200 µl
TEMED	25 µl	25 µl
SDS 10% (wt/vol)	300 µl	300 µl

4x Trenngelpuffer:

Tris/HCl	1,5 mol/l (pH 8,8)
SDS	0,4% (wt/vol)

Sammelgel:

AA/BA (30:1)	2,4 ml
Sammelgelpuffer	5 ml
aqua bidest	12,8 ml
APS 10% (vol/vol)	300 µl
TEMED	30 µl
SDS 10 % (wt/vol)	300

Sammelgelpuffer:

Tris/HCl	0,5 mol/l (pH 6,8)
SDS	0,4% (wt/vol)

Die Elektrophoresekammer wird mit Laufpuffer befüllt und anschließend eine Spannung von 200 mV angelegt.

Laufpuffer:

Glycin	1,44% (wt/vol)
Tris/HCl	0,3% (wt/vol)
SDS	0,1% (wt/vol)

3.4.3. Western-Blot-Verfahren

Mit der Technik des ElektrobloTTings lassen sich die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine eines SDS-Gels vollständig auf eine synthetische Trägermembran transferieren. Von den zwei gebräuchlichen Transfermethoden ist in dieser Arbeit das Semidry-Blotting angewandt worden, das erstmals 1984 von Kyse-Andersen beschrieben wurde. Zwischen zwei Plattenelektroden wird ein Blotsandwich horizontal in einer bestimmten Reihenfolge aufgebaut (siehe Grafik). Das diskontinuierliche Puffersystem erlaubt einen relativ gleichmäßigen Transfer und gleichzeitig wenig Störungen durch reaktive Verunreinigungen.

Die in die drei Puffer getränkten Filterpapiere umgeben die Blotmembran (PVDF) mit dem darüber gelegten Trenngel. Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten müssen vorsichtig mit einem Glasstab ausgerollt werden.

Für den zweistündigen Transfer wird eine Stromstärke von 1 mA/cm^2 gewählt.

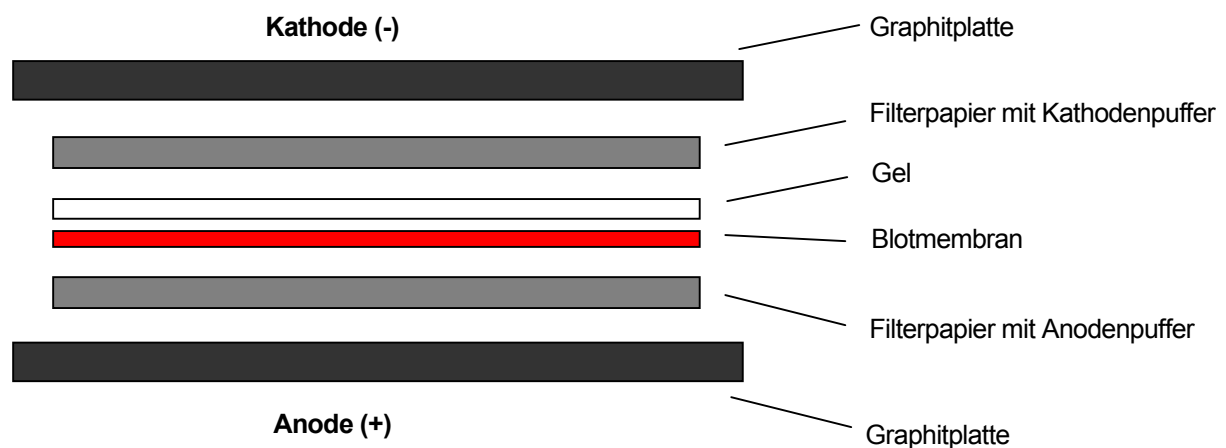


Abb.3.2: Semidry-Blotting. Querschnitt durch den Aufbau eines Blotsandwich.

konzentrierter Anodenpuffer :

Tris/HCl	300 mmol/l
Methanol	20 % (v/v)
pH 10,4	

Anodenpuffer :

Tris/HCl	30 mmol/l
Methanol	20 % (v/v)
pH 10,4	

Kathodenpuffer :

Tris/HCl	25 mmol/l
6-Aminohexansäure	40 mmol/l
Methanol	20 % (v/v)
pH 9,4	

3.4.4. Immunologische Nachweisverfahren

Die Proteine, die jetzt auf der Blotmembran in derselben geometrischen Anordnung vorliegen wie nach der Auftrennung im Gel, müssen nun durch ein geeignetes Detektionssystem visualisiert werden. Bei der hier gewählten Technik bindet ein Primärantikörper spezifisch an sein immobilisiertes Antigen auf der Membran, während ein zweiter Antikörper, der mit einem Amplifikator markiert ist, an alle Primärantikörper derselben Spezies bindet. Diese so genannte indirekte Anordnung bietet eine hohe Sensitivität bei gleichzeitig einfacher Durchführung.

Zunächst wird die Blotmembran für 2 h in 2% (wt/vol) BSA-Lösung (in TBS gelöst) abgesättigt und anschließend zweimal für 5 min in TBS gewaschen.

TBS :

Tris/HCl	10 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
pH 7,4	

Es folgt die zweistündige Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper. Die Detektion der p42 Map-Kinase erfolgte über einen polyklonalen Antikörper (rabbit), der in einer Konzentration von 0,2 µg/ml eingesetzt wird. Für die PKC-Isoformen werden polyklonale Antikörper der Maus in einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet. Nach drei jeweils 10 min dauernden Waschschritten mit 0,2% (vol/vol) Triton in TBS werden die Blotmembranen für 2 h mit dem Sekundärantikörper beschichtet. Bei den Zweitantikörpern handelt es sich um polyklonale anti rabbit IgG (50 mU/50 ml) und polyklonale anti mouse IgG, die beide mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind.

Antikörperlösung :

Tris/HCl	50 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
Tween 20	0,05 % (v/v)
BSA	2 % (w/v)
pH 7,4	

Die ungebundenen Sekundärantikörper werden durch zwei fünfminütige Waschvorgänge mit 0,5 % (vol/vol) Triton in TBS entfernt. Die Blotmembran kann jetzt entwickelt oder gekühlt einige Tage aufbewahrt werden.

Die Fähigkeit der alkalischen Phosphatase, katalytisch optische oder chemilumineszente Substrate wie BCIP/NBT umzusetzen, führt zur Bildung eines violetten Präzipitates. Die Intensität der Banden kann durch die Entwicklungszeit bestimmt und durch ein Wasserbad abrupt abgestoppt werden. Die entwickelten Blotmembranen werden getrocknet, eingescannt und densitometrisch ausgewertet.

Bei der Auswertung der p42 MAP-Kinase müssen für jede Probe zwei Banden detektiert werden. Im aktivierten Zustand ist das Enzym zweifach phosphoryliert und separiert sich so von der nicht-aktivierten, dephosphorylierten Form [20]. Die Ergebnisse der ERK-Aktivierung werden als Verhältnis der dimensionslosen Einheiten (AU) von phosphorylierter ERK zu gesamt ERK angegeben:

$$\text{ERK-Aktivierung} = \frac{\text{AU}_{\text{ERK-P}}}{\text{AU}_{\text{ERK-P}} + \text{AU}_{\text{ERK}}}$$

Entwicklerlösung:

AP-Puffer	40,0 ml
BCIP	5,2 mg
NBT	13,2 mg

AP-Puffer:

Tris/HCl	100 mmol/l
MgCl ₂	5 mmol/l
NaCl	10 mmol/l
pH 9,5	

4. Ergebnisse

4.1. Die Beteiligung verschiedener PKC-Isoformen an der α -adrenerg vermittelten Steigerung der Proteinsynthese

4.1.1. Pharmakologische Hemmung der PKC-Isoformen

In der ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss sechs unterschiedlicher PKC-Inhibitoren auf die Proteinsynthese unter α -adrenerger Stimulation untersucht. Hierzu wurden die Kardiomyozyten mit dem jeweiligen Hemmstoff für ca. 15 min vorinkubiert und anschließend für 24 h mit PE induziert. Die verwendeten PKC-Inhibitoren wiesen entweder keine Isoform-Spezifität auf oder konnten mit unterschiedlicher Spezifität sowohl Ca^{2+} -abhängige als auch Ca^{2+} -unabhängige Isoformen hemmen.

Jeder Hemmstoff wurde parallel in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Anhand seiner Wirkung auf die Proteinsynthese ließen sich Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellen, aus denen die jeweils zugehörigen IC_{50} -Werte berechnet wurden.

Abb. 4.1 stellt die Ergebnisse der drei PKC-Inhibitoren dar, die konzentrationsabhängig die Steigerung der Proteinsynthese durch PE hemmen konnten. Gö6983 hemmte den PE-induzierten Anstieg der Proteinsynthese mit einem IC_{50} -Wert von ungefähr 11 nmol/l, für Rottlerin konnte ein Wert von 6 $\mu\text{mol/l}$ und für Gö6850 konnte ein IC_{50} -Wert von 145 nmol/l berechnet werden. Ein Vergleich dieser Werte mit den jeweiligen IC_{50} -Werten der zugehörigen Inhibitoren für die einzelnen Isoformen deutet darauf hin, dass insbesondere die Ca^{2+} -unabhängigen PKC-Isoformen δ und ϵ an dem PE-induzierten Anstieg der Proteinsynthese beteiligt sind (Tab. 4.1).

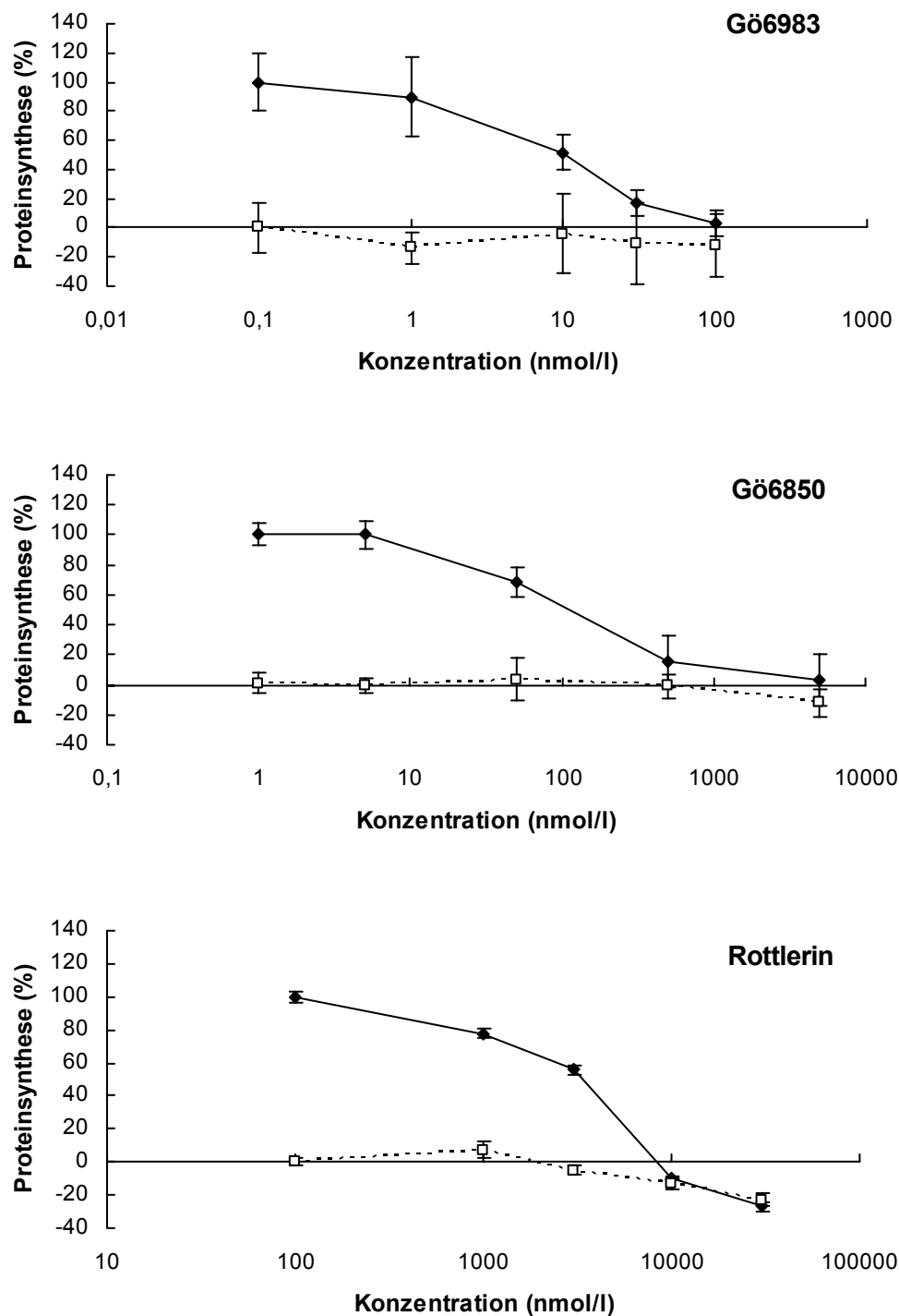


Abb.4.1: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die drei PKC-Inhibitoren Gö6983, Gö6850 und Rottlerin und ihr Einfluss auf die Steigerung der Proteinsynthese. Der maximale Anstieg der Proteinsynthese unter α -adrenerger Stimulation in Abwesenheit eines Hemmstoffes ist auf 100% gesetzt worden. Dies ist eine Steigerung von 28% gegenüber den Kontrollen der Experimente, in denen Gö6983 eingesetzt wurde, 32% gegenüber den Kontrollen der Experimente mit Gö6850 und 29% gegenüber der Kontrollserie, in denen der Hemmstoff Rottlerin eingesetzt wurde.

Die geschlossenen Symbole repräsentieren Daten, die unter Stimulation mit PE gewonnen wurden, die offenen Symbole repräsentieren Daten in Abwesenheit von PE. MW \pm SD, n = 4.

Die IC₅₀-Werte der eingesetzten PKC-Inhibitoren für die PE-induzierte Steigerung der Proteinsynthese

Inhibitor	Berechnet IC ₅₀ (nmol/l)	Alpha IC ₅₀ (nmol/l)	Beta IC ₅₀ (nmol/l)	Delta IC ₅₀ (nmol/l)	Epsilon IC ₅₀ (nmol/l)
Gö6850 [40]	145±4	8	18	210	132
Gö6983 [41]	11±6	7	7	10	-
Rottlerin [42]	5904±2799	30000	42000	6000	80000
Ro-32-0432 [43]	-	9	28	-	108
HBDDE [44]	-	43000	-	-	-
Gö6976 [40]	-	2	6	-	-

Tab.4.1: Dargestellt sind die IC₅₀-Werte, die aus den erstellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven berechnet werden konnten und die jeweiligen IC₅₀-Werte der sechs PKC-Inhibitoren für die einzelnen PKC-Isoformen, wie sie in der Literatur angegeben sind.

Die Ergebnisse drei weiterer PKC-Inhibitoren, Ro-32-0432, HBDDE und Gö6976, sind in Abb. 4.2 dargestellt. Die Hemmstoffe dieser Gruppe inhibieren überwiegend die Ca²⁺-abhängigen PKC-Isoformen. Aus den erstellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven lassen sich keine inhibitorischen Effekte bezüglich einer PE-induzierten Steigerung der Proteinsynthese ableiten, das heißt, durch eine Hemmung Ca²⁺-abhängiger PKC-Isoformen konnte die hypertrophe Antwort auf eine α -adrenerge Stimulation nicht supprimiert werden.

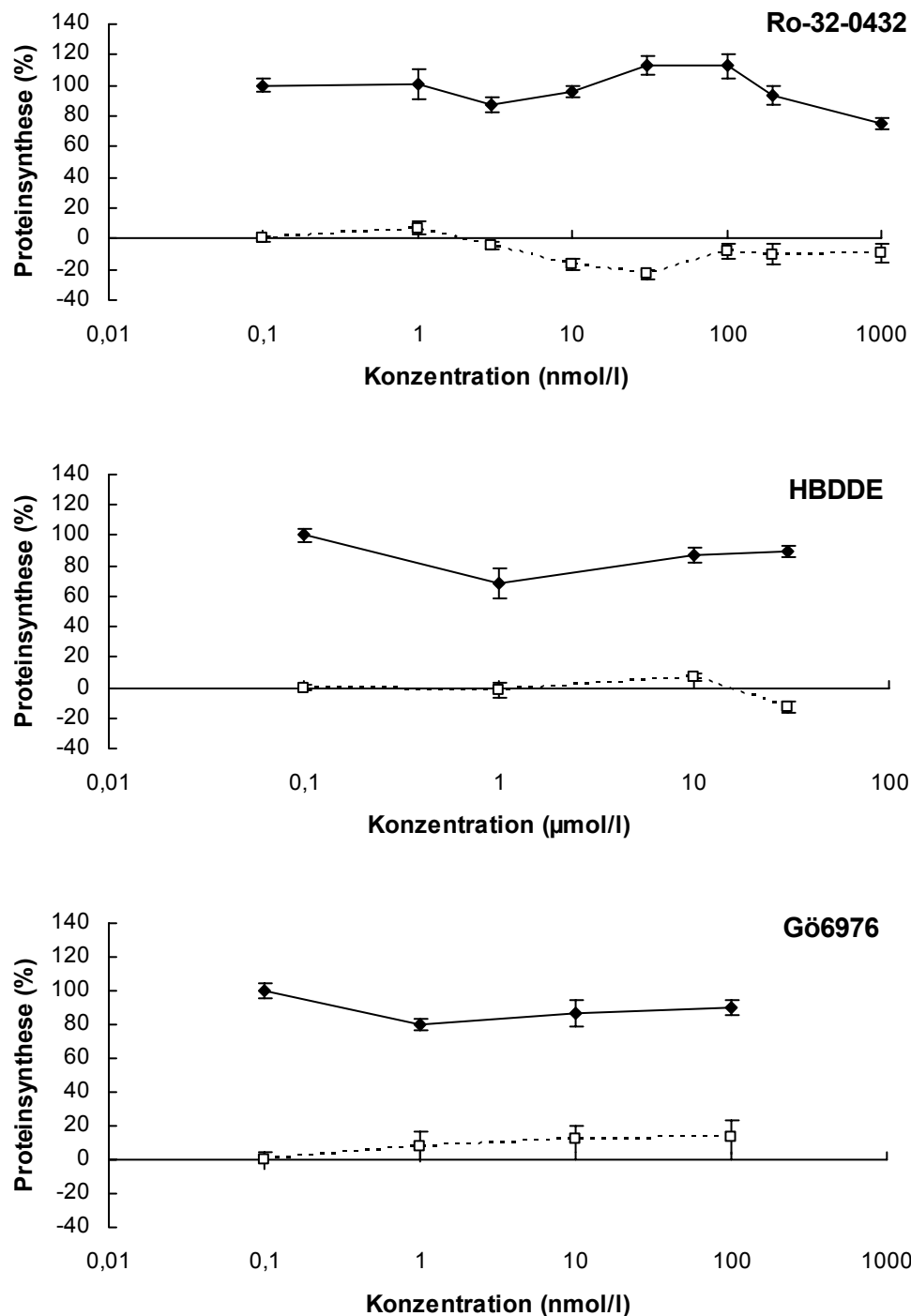


Abb.4.2: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die drei PKC-Inhibitoren Ro-32-0432, HBDDE und Gö6976 und ihr Einfluss auf die Steigerung der Proteinsynthese. Der maximale Anstieg der Proteinsynthese unter α -adrenerger Stimulation in Abwesenheit eines Hemmstoffes ist auf 100% gesetzt worden. Dies ist eine Steigerung von 29% gegenüber den Kontrollen der Experimente, in denen Ro-32-0432 eingesetzt wurde, 40% gegenüber den Kontrollen der Experimente mit HBDDE und 28% gegenüber der Kontrollserie, in denen der Hemmstoff Gö6976 eingesetzt wurde.

Die geschlossenen Symbole repräsentieren Daten, die unter Stimulation mit PE gewonnen wurden, die offenen Symbole repräsentieren Daten in Abwesenheit von PE. MW \pm SD, n = 4.

4.1.2. Transfektion der Kardiomyozyten mit Antisense-Oligonukleotiden

Zur Verifikation der Ergebnisse, die mit den pharmakologischen Hemmstoffen gegen die PKC-Isoformen generiert wurden, erfolgte eine Transfektion der Kardiomyozyten mit Antisense-Oligonukleotiden gegen die Isoformen PKC- α , PKC- δ und PKC- ϵ .

Die Antisense-Oligonukleotide führten nach 24stündiger Inkubation zu einer signifikanten Reduktion ihrer korrespondierenden PKC-Isoform. Die Down-Regulation der jeweiligen Isoform erfolgte hierbei mit hoher Spezifität. So erreichte das gegen die PKC- δ gerichtete Oligonukleotid einen Rückgang von deren Expression auf $40 \pm 5\%$ der Kontrolle, wohingegen die Expression der PKC- δ in Kulturen, die mit dem Oligonukleotid gegen die PKC- α transfiziert wurden, nur auf $94 \pm 9\%$ reduziert wurde.

Eine Transfektion der Zellen mit dem Antisense-Oligonukleotid gegen die PKC- α führte zu einem Rückgang der PKC- α Expression auf $29 \pm 11\%$ des Kontrollwertes. In Zellen, die mit dem Oligonukleotid gegen die PKC- δ inkubiert wurden, war hingegen eine Reduktion der PKC- α Expression auf nur $67 \pm 15\%$ festzustellen.

Die Expression der PKC- ϵ konnte durch ihr entsprechendes Antisense-Oligonukleotid auf $53 \pm 4\%$ der Kontrolle verringert werden (Abb. 4.3).

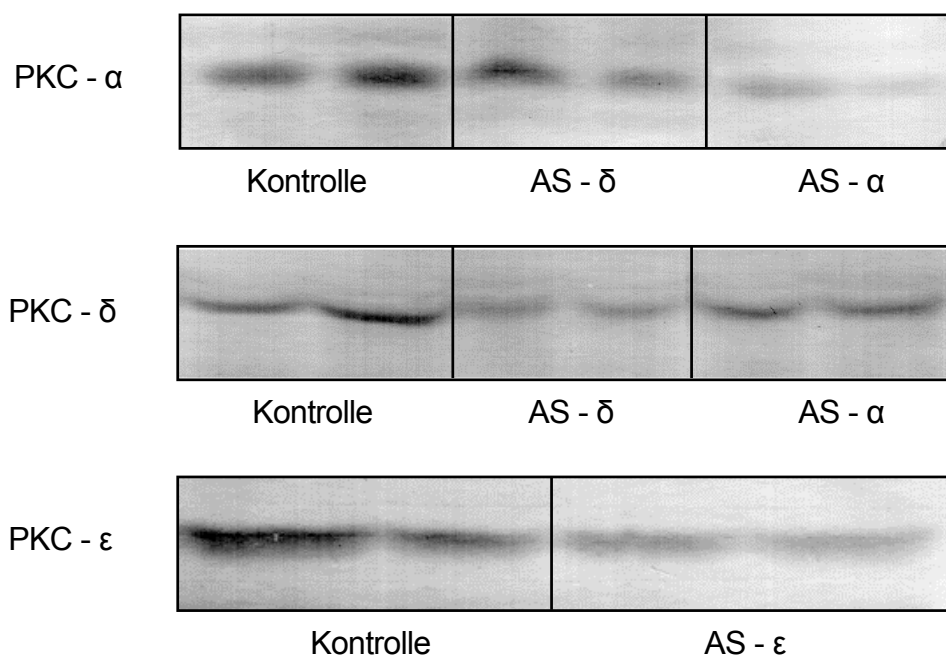


Abb.4.3: Selektive Down-Regulation der PKC-Isoformen mit Antisense-Oligonukleotiden gegen die PKC-Isoformen α , δ und ϵ .

Nachdem die Spezifität der verwendeten Antisense-Oligonukleotide sichergestellt war, konnte in einer weiteren Versuchsreihe das PE-induzierte hypertrophe Wachstum in Abhängigkeit einer selektiven Down-Regulation einzelner PKC-Isoformen untersucht werden. Abb. 4.4 stellt die Ergebnisse dieser Versuche dar, in denen die Kardiomyozyten für 24 h mit einem der Antisense-Oligonukleotide transfiziert und anschließend für weitere 24 h mit PE induziert wurden. Kulturen, in denen die PKC- δ oder die PKC- ϵ selektiv down-reguliert wurden, wiesen eine signifikante Abschwächung der PE-induzierten Steigerung der Proteinsynthese auf. Im Gegensatz hierzu hatte die Down-Regulation der PKC- α keinen inhibierenden Einfluss auf den Anstieg der Proteinsynthese.

Obgleich der Anstieg der Proteinsynthese durch Down-Regulation der PKC- δ oder der PKC- ϵ signifikant auf ein ähnlich niedriges Niveau gemindert werden konnte, gelang es nicht, diesen vollständig zu inhibieren. Wie zuvor gezeigt, war es allerdings auch nicht möglich, die Expression der PKC-Isoformen durch die Antisense-Oligonukleotide vollständig zu supprimieren.

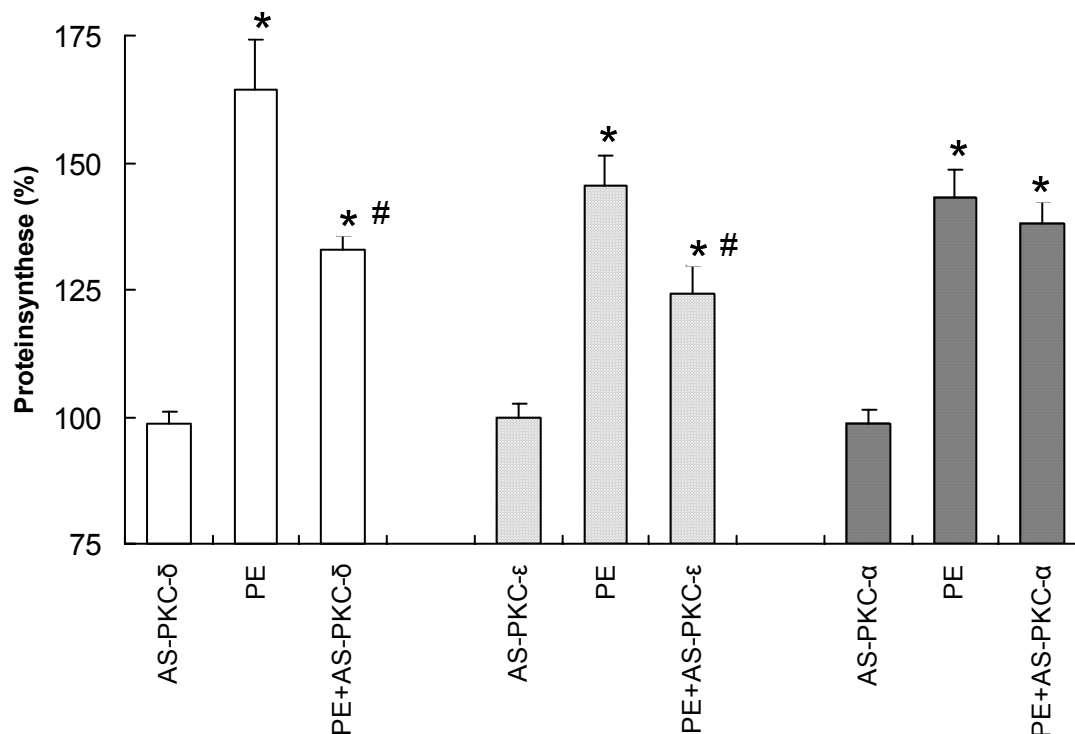


Abb.4.4: Einfluss einer selektiven Down-Regulation der PKC- δ , der PKC- ϵ und der PKC- α auf die PE-induzierte Steigerung der Proteinsynthese. Parallel wurden die Zellen entweder mit einem der Antisense-Oligonukleotide transfiziert, mit PE induziert oder erhielten nach 24stündiger Transfektion mit einem AS-Oligonukleotid zusätzlich für weitere 24 h PE. MW \pm SD, n = 16, * p < 0,05 vs. Kontrolle, # p < 0,05 vs. PE.

Durch Transfektion der Zellen mit Antisense-Oligonukleotiden gegen die Ca^{2+} -unabhängigen PKC-Isoformen δ und ϵ konnte der Anstieg der Proteinsynthese im Vergleich zur alleinigen Induktion der Zellen mit PE um bis zu 50% reduziert werden. Die PKC- α spielte hier als Ca^{2+} -abhängige Isoform nur eine untergeordnete Rolle. Durch ihre Down-Regulation ließ sich der PE-induzierte Anstieg um maximal 12% mindern.

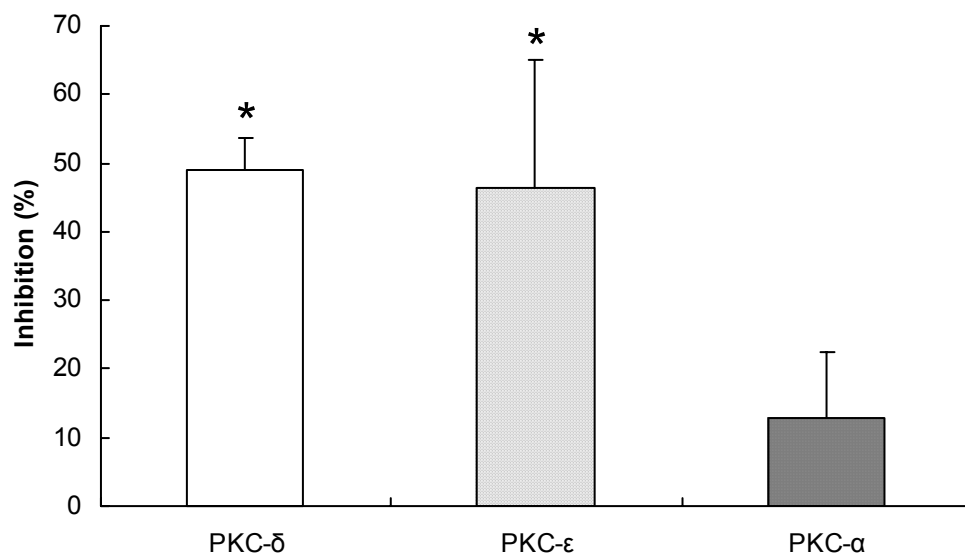


Abb.4.5: Hemmung der Proteinsynthese durch selektive Down-Regulation der PKC- δ , PKC- ϵ und PKC- α , bezogen auf den maximalen PE-induzierten Anstieg der Proteinsynthese in der jeweils zugehörigen Versuchsreihe. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.2. Der Einfluss Ca^{2+} -abhängiger PKC-Isoformen auf die ERK-Aktivierung

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss einer selektiven Hemmung Ca^{2+} -abhängiger PKC-Isoformen auf den zeitlichen Verlauf der ERK-Aktivierung untersucht. Die Überführung der ERK in ihre aktive Form erfolgt durch zweifache Phosphorylierung. In diesem Zustand verringert sich die Wanderungsgeschwindigkeit in der Gelelektrophorese gegenüber der nicht-aktivierten Form. Auf Immunoblots lässt sich so eine basal gelegene Bande (nicht-aktivierte ERK) von einer darüberliegenden (aktivierte ERK) getrennt darstellen.

Die Kardiomyozyten wurden für ca. 15 min mit einem der PKC-Inhibitoren HBDDE oder Gö6976 vorinkubiert und anschließend für 5 bzw. 90 min mit PE stimuliert. Abb. 4.6 veranschaulicht die Auswirkungen einer Hemmung Ca^{2+} -abhängiger PKC-Isoformen auf die Aktivierung der ERK. In Gegenwart von HBDDE oder Gö6976 führte die Stimulation mit PE zu einer signifikanten Verlängerung der ERK-Aktivierung. Beide Hemmstoffe hatten jedoch keinen Einfluss auf die frühe Aktivierung der ERK innerhalb der ersten 5 min.

In dieser Frühphase führte die α -adrenerge Stimulation mit PE zu einem Anstieg des phosphorylierten Anteils in Relation zur gesamten detektierten ERK von $14,3 \pm 5,4\%$ auf $57,5 \pm 3,7\%$ ($n = 4$). In Gegenwart von HBDDE erhöhte PE diesen Quotienten auf ein ähnlich hohes Niveau von $60,4 \pm 2,7\%$ ($n = 4$), in Gegenwart von Gö6976 auf $55,3 \pm 6,7\%$ ($n = 4$). Die Aktivierung der ERK durch fünfminütige Induktion der Zellen mit PE führte unabhängig von der Gegenwart eines der verwendeten Inhibitoren gegen Ca^{2+} -abhängige PKC-Isoformen zu nahezu identischen Ergebnissen.

Die Stimulation der Zellen mit PE für 90 min führte hingegen zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich Dauer und Intensität der ERK-Aktivierung. In Gegenwart von HBDDE oder Gö6976 blieb der Anteil phosphorylierter und somit aktivierter ERK signifikant gegenüber der alleinigen Stimulation mit PE erhöht (Abb.4.7).

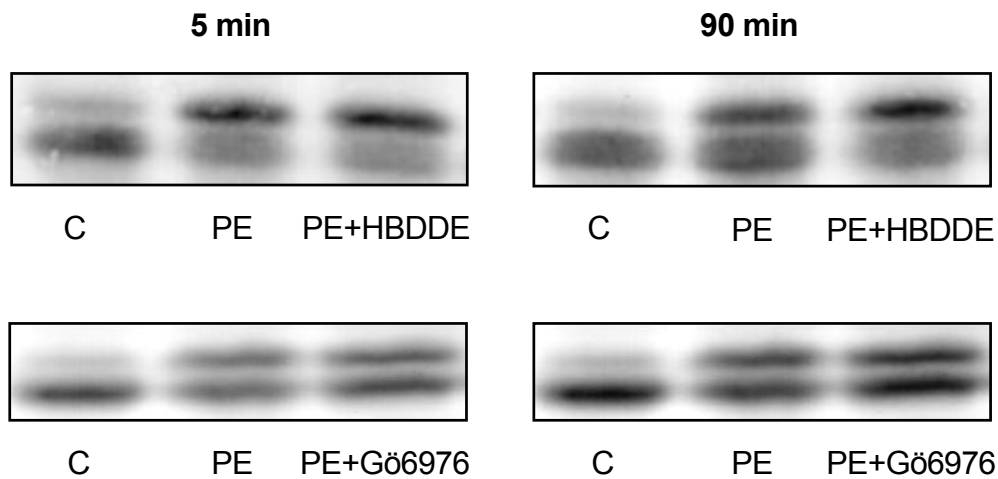


Abb.4.6: Aktivierung der ERK. Die Auswertung erfolgte 5 bzw. 90 min nach Stimulation mit PE. Die obere der zwei übereinanderliegenden Banden repräsentiert den aktivierten Anteil der ERK. Die Kontrollgruppe (C) blieb unbehandelt, parallel erfolgte die Stimulation der Zellen mit PE alleine und nach Vorinkubation mit HBDDE (50 µmol/l) oder Gö6976 (100 nmol/l).

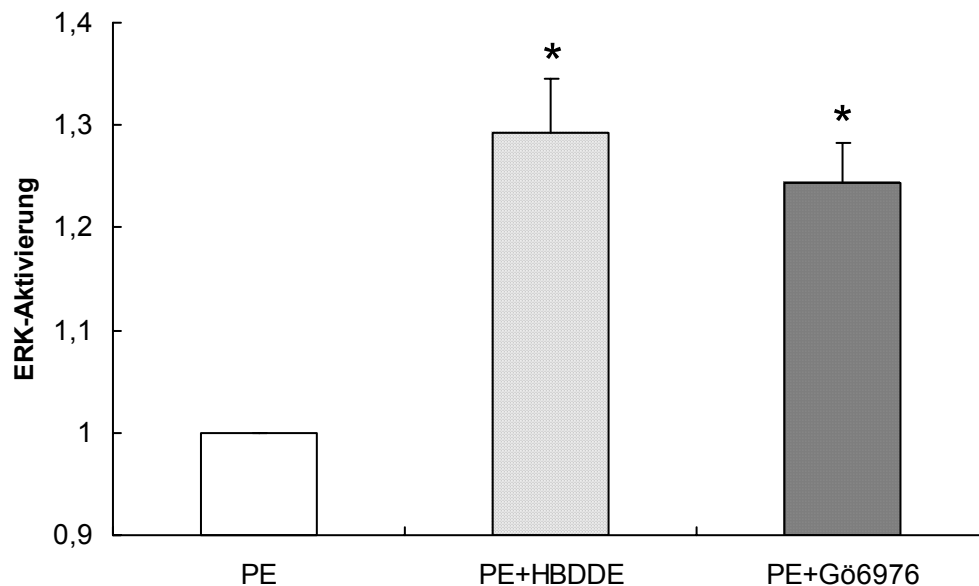


Abb.4.7: ERK-Aktivierung 90 min nach Stimulation mit PE. Die Aktivität, dargestellt als Quotient aus aktivierter ERK zur gesamten ERK, liegt durch Hemmung Ca^{2+} -abhängiger PKC-Isoformen in Relation zur alleinigen Stimulation mit PE um ca. 30% höher. Die Aktivität der ERK unter PE wurde auf eins indexiert; MW±SD, n = 4, * p < 0,05 vs. PE.

4.3. Einfluss der ERK auf die Proteinsynthese unter α -adrenerger Stimulation

Durch Hemmung Ca^{2+} -abhängiger PKC-Isoformen ließ sich die transiente Aktivierung der ERK in eine konstitutive überführen. In wieweit dieser Effekt an der Regulation des PE-induzierten hypertrophen Wachstums beteiligt ist, wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht.

Zunächst konnte bestätigt werden, dass durch Stimulation der Zellen mit PE die Steigerung der Proteinsynthese ERK-unabhängig reguliert wird [20,28]. Dies konnte durch den Einsatz des MAP-Kinase Kinase Inhibitors PD98059 gezeigt werden. Der PE-induzierte Anstieg der Proteinsynthese ließ sich durch Vorinkubation der Zellen mit PD98059 nicht hemmen.

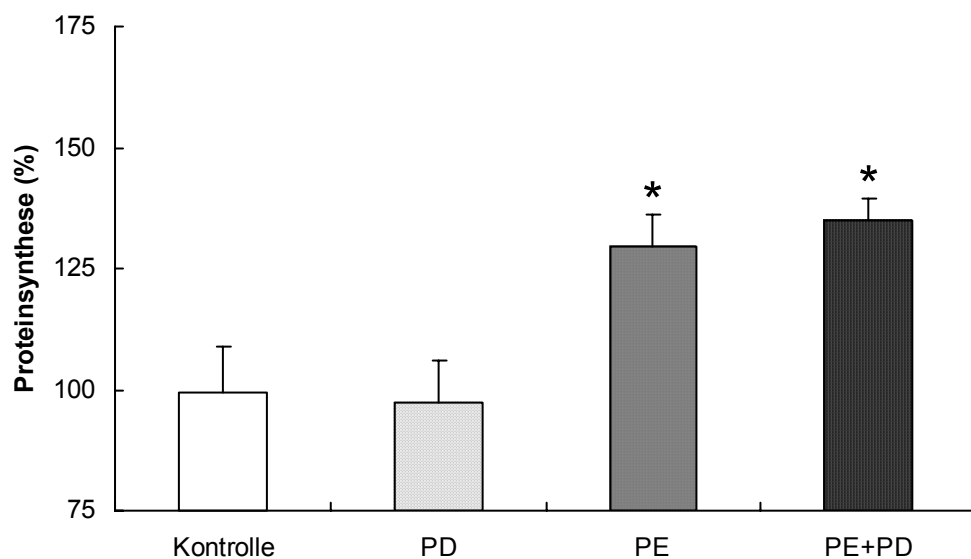


Abb.4.8: Einfluss des MAP-kinase kinase Inhibitors PD98059 auf die PE-induzierte Steigerung der Proteinsynthese. Parallel zur Kontrolle (C) wurden die Zellen für 24h mit PD (10 $\mu\text{mol/l}$), mit PE (10 $\mu\text{mol/l}$) und nach Vorinkubation mit PD für 15 min anschließend mit PE induziert. MW \pm SD, n = 16, * p < 0,05 vs. Kontrolle.

Der MAPK-Inhibitor PD98059 war jedoch in der Lage, den PE-induzierten Anstieg der Proteinsynthese signifikant zu hemmen, wenn zuvor die Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen durch HBDDE oder Gö6976 inhibiert wurden (Abb.4.9). Unter diesen Bedingungen wurde das hypertrophe Wachstum der Kardiomyozyten unter dem Einfluss einer konstitutiv aktivierten ERK reguliert.

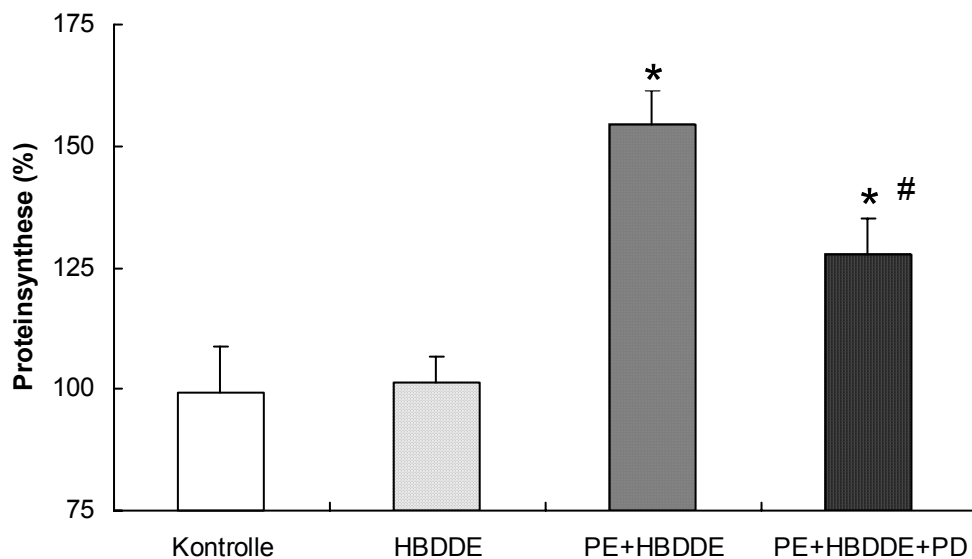
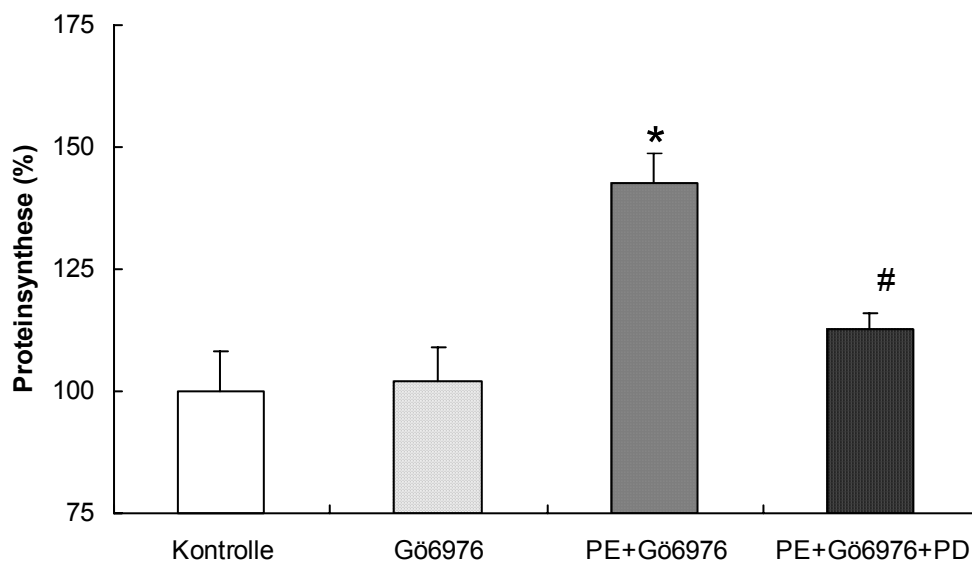
A**B**

Abb.4.9: Hemmung der PE-induzierten Steigerung der Proteinsynthese durch den MAP kinase kinase Inhibitor PD98059 nach Vorinkubation der Zellen mit den PKC-Inhibitoren HBDDE (A) und Gö6976 (B). MW \pm SD, n = 16, * p < 0,05 vs. Kontrolle, # p < 0,05 vs. PE + HBDDE, # p < 0,05 vs. PE + Gö6976.

5. Diskussion

Neurohumorale Anpassungsvorgänge, wie die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und des sympathischen Nervensystems, stellen zunächst sinnvolle Kompensationsmechanismen einer beginnenden Herzinsuffizienz dar, die jedoch im weiteren Verlauf zur strukturellen und funktionellen Verschlechterung des Myokards beitragen. In der vorliegenden Studie wurden invitro Signaltransduktionsschritte charakterisiert, die an der Regulation einer α -adrenerg induzierten Steigerung der Proteinsynthese in ventrikulären Herzmuskelzellen beteiligt sind. Besondere Schwerpunkte wurden hierbei auf die Rolle der PKC-Isoformen und der ERK-Aktivierung gelegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren auf Erkenntnissen früherer Experimente, in denen die Effekte der beiden hypertrophen Stimuli Phenylephrin und Angiotensin II hinsichtlich des hypertrophen Wachstums verglichen wurden. Für die aktuellen Fragestellungen waren besonders die Unterschiede in der Präferenz einzelner PKC-Isoformen und der ERK-Abhängigkeit bezüglich der Proteinsynthese von Interesse [29].

5.1. Hauptbefunde

- Im Rahmen dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass α -Adrenozeptor-induziertes hypertrophes Wachstum auf einer Aktivierung Ca^{2+} -unabhängiger PKC-Isoformen basiert.
- Die alleinige Stimulation der Zellen mit Phenylephrin hat eine schnelle, aber nur transiente Aktivierung der ERK zur Folge. Die gleichzeitige Hemmung Ca^{2+} -abhängiger PKC-Isoformen führt jedoch zu einer signifikanten Verlängerung starker ERK-Aktivierung.
- Die Phenylephrin-induzierte Steigerung der Proteinsynthese erfolgt ERK-unabhängig. Durch eine Hemmung Ca^{2+} -abhängiger PKC-Isoformen wird die ERK konstitutiv aktiviert und trägt so zur Steigerung der Proteinsynthese in ventrikulären Herzmuskelzellen bei.

5.2. Ca^{2+} -unabhängige PKC-Isoformen vermitteln die α -adrenerg induzierte Steigerung der Proteinsynthese

Eine selektive Stimulation α -adrenerger Rezeptoren durch Phenylephrin ruft eine deutliche Zunahme der Proteinsynthese isolierter Kardiomyozyten der adulten Ratte hervor. Durch eine gleichzeitige Inkubation der Zellen mit den PKC Inhibitoren Gö6850 oder Gö6983 lässt sich dieses hypertrophe Wachstum der Herzmuskelzellen signifikant hemmen [26]. Die Myokardzellhypertrophie wird folglich über einen PKC-abhängigen Signalmechanismus vermittelt.

Ventrikuläre Kardiomyozyten exprimieren PKC-Isoformen aus drei Subfamilien. Aus der Familie der klassischen, Ca^{2+} -abhängigen Isoformen spielen die PKC- α und die PKC- β die dominierende Rolle. Von den Ca^{2+} -unabhängigen Isoformen der n(novel)-Familie werden vor allem die PKC- δ und PKC- ϵ exprimiert. Zwei weitere atypische Isoformen, die in Kardiomyozyten exprimiert werden, sind die PKC- ζ und die PKC- λ . Mitglieder aus dieser Familie lassen sich weder durch Calcium noch durch Phorbol ester aktivieren. Der Tumor-Promotor Phorbol ester wirkt über eine direkte Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger und Ca^{2+} -unabhängiger PKC-Isoformen. Dies führt ebenso wie die α -adrenerge Stimulation zu einer Induktion der Proteinsyntheserate [26,35]. Atypische PKC-Isoformen tragen folglich nicht zum hypertrophen Wachstum ventrikulärer Herzmuskelzellen bei und wurden deshalb in den Experimenten nicht berücksichtigt.

Die Phenylephrin-induzierte Steigerung der Proteinsynthese ventrikulärer Kardiomyozyten ist allein auf eine Aktivierung Ca^{2+} -unabhängiger PKC-Isoformen zurückzuführen. Dieses Resultat basiert auf den Ergebnissen einer pharmakologischen Hemmung einzelner PKC-Isoformen. Durch den anschließenden Einsatz spezifischer Antisense-Oligonukleotide konnten die zuvor gewonnenen Daten verifiziert werden.

Von den eingesetzten pharmakologischen Inhibitoren waren drei in der Lage, den Phenylephrin-induzierten Anstieg der Proteinsynthese konzentrationsabhängig zu reduzieren. Diese drei Hemmstoffe besitzen das Potential, mit unterschiedlich hoher Potenz die Ca^{2+} -unabhängigen PKC Isoformen δ und ϵ zu hemmen. Diese Ergebnisse konnten in einer nachfolgenden Versuchsreihe durch selektive Down-Regulation der PKC- δ und - ϵ bestätigt werden.

Für drei weitere Inhibitoren, die selektiv das Spektrum Ca^{2+} -abhängiger PKC-Isoformen hemmen, konnte kein Effekt auf das Phenylephrin-induzierte hypertrophe Wachstum nachgewiesen werden. Überdies hatte eine selektive Down-Regulation der PKC- α um ca. 80 % keinen Einfluss auf die α -adrenerg vermittelte Steigerung der Proteinsynthese [36].

Innerhalb der Gruppe Ca^{2+} -unabhängiger PKC-Isoformen konnte jedoch keine eindeutige Prävalenz für eine der Isoformen gefunden werden. Einzig die Unfähigkeit des PKC-Inhibitors Ro-32-0432, den Phenylephrin-induzierten Anstieg der Proteinsynthese zu hemmen, spricht für eine dominierende Rolle der PKC- δ .

Steigerung der Proteinsynthese durch α -adrenerge Stimulation

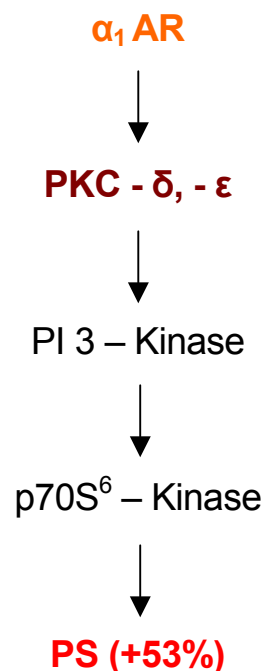


Abb.5.1: Eine Aktivierung Ca^{2+} -unabhängiger PKC-Isoformen vermittelt die α -adrenerg induzierte Zunahme der Proteinsynthese in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der adulten Ratte.

5.3. Die Partizipation der ERK an der Regulation kardialer Proteinsynthese

In wieweit die MAP-Kinase ERK an der Regulation kardialer Proteinsynthese beteiligt ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. An Kulturmodellen neonataler Kardiomyozyten konnte mehrfach demonstriert werden, dass die Aktivierung verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptorsysteme eine Aktivierung der ERK und hierüber eine Steigerung der Proteinsynthese nach sich zieht [28,31,32]. Bis heute besteht allerdings keine einheitliche Meinung darüber, ob eine Phenylephrin-induzierte Steigerung der Proteinsynthese in neonatalen Kardiomyozyten ERK-abhängig oder ERK-unabhängig reguliert wird [32,37,38].

Die vorliegende Arbeit basiert auf einem Kulturmodell adulter ventrikulärer Kardiomyozyten. Terminal ausdifferenzierte Herzmuskelzellen erscheinen als Modell für eine sich entwickelnde Myokardhypertrophie unter pathophysiologisch veränderten hämodynamischen Bedingungen sinnvoller. Für diesen Zelltyp konnte bereits gezeigt werden, dass die α -adrenerg induzierte Hypertrophie ERK-unabhängig reguliert wird [20,26,27]. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese unterschiedlichen Regulationsmechanismen hinsichtlich der Proteinsynthese könnte im Verlust der ERK-Abhängigkeit während der Differenzierung neonataler Signalwege zu finden sein. Doch die Fähigkeit adulter Kardiomyozyten, eine durch hypertrophe Stimuli induzierte Steigerung der Proteinsynthese ERK-abhängig zu regulieren, ist nicht vollständig verloren gegangen. So wird die Angiotensin II vermittelte kardiale Hypertrophie über eine Aktivierung Ca^{2+} -unabhängiger PKC-Isoformen und einer nachfolgend konstitutiv aktivierten ERK reguliert [29].

Angiotensin II und Phenylephrin unterscheiden sich folglich nicht nur in ihrer Eigenschaft die Proteinsynthese ERK-abhängig bzw. -unabhängig zu regulieren, sondern auch in der Dauer mit der sie die ERK aktivieren. In beiden Signalwegen ist die PKC der ERK vorgeschaltet. Phenylephrin aktiviert sowohl die Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen α und β als auch die Ca^{2+} -unabhängigen PKC-Isoformen δ und ϵ . Angiotensin II hingegen zeigt hier eine deutliche Prävalenz für die Ca^{2+} -unabhängigen PKC-Isoformen δ und ϵ .

5.4. Der Einfluss Ca^{2+} -abhängiger PKC-Isoformen auf die ERK-Aktivierung

Die Aktivierung der ERK erfolgt über ein streng hierarchisch angeordnetes System verschiedener Proteinkinasen. Durch α -adrenerge Stimulation wird durch eine Aktivierung der PKC diese Proteinkinasen-Kaskade gestartet, die letztendlich in einer zweifachen Phosphorylierung und somit Aktivierung der ERK mündet.

Innerhalb dieses Signalweges nehmen die Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen Einfluss auf die Phenylephrin-spezifische Aktivierung der ERK. Zwei unabhängige Studien konnten zeigen, dass Phenylephrin eine schnelle, aber nur transiente Aktivierung der ERK herbeiführt [20,29]. Die gleichzeitige Hemmung der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen führt in der Frühphase ebenfalls zu einer schnellen Aktivierung der ERK mit hoher Intensität. In der Spätphase nach 90 min bleibt jedoch der Anteil aktivierter ERK weiterhin mit hoher Intensität signifikant gegenüber der alleinigen Stimulation mit Phenylephrin erhöht.

5.5. Die ERK-abhängige Regulation der Phenylephrin-induzierten Steigerung der Proteinsynthese

Durch Hemmung Ca^{2+} -abhängiger PKC-Isoformen lässt sich die transiente Aktivierung der ERK in eine konstitutive überführen. Unter diesen Bedingungen wird die Phenylephrin-induzierte Proteinsynthese ERK-abhängig gesteigert. Die Hemmung der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen α und β deckt folglich einen Regulationsmechanismus der α -adrenerg induzierten Proteinsynthese auf Ebene der ERK auf.

Die Steigerung der Proteinsynthese durch Inkubation der Zellen mit Angiotensin II wird über eine Aktivierung Ca^{2+} -unabhängiger PKC-Isoformen und nachfolgend über eine verzögerte, jedoch konstitutive Aktivierung der ERK hervorgerufen. Diese lang anhaltende ERK-Aktivierung ist wahrscheinlich auch in den aktuellen Versuchen eine Vorbedingung für die Kopplung an den α -adrenergen Proteinmetabolismus.

ERK-abhängige Regulation der Proteinsynthese durch Hemmung Ca^{2+} -abhängiger PKC-Isoformen

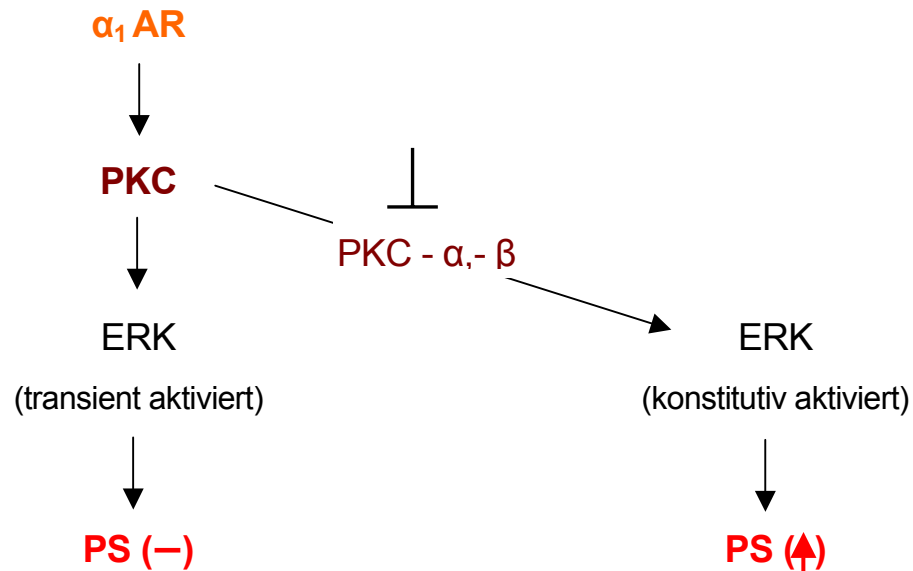


Abb.5.2: Durch Hemmung der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen α und β trägt die konstitutiv aktivierte ERK zur Steigerung der α -adrenerg vermittelten Proteinsynthese bei.

Diese Ergebnisse entsprechen den Resultaten einer erst kürzlich veröffentlichten Studie, in der transgene Mäuse, bedingt durch die Expression einer konstitutiv aktivierten MAP-Kinase Kinase, über eine dauerhaft aktivierte ERK verfügen. Diese Mäuse entwickelten aufgrund der gesteigerten Proteinsynthese, hervorgerufen durch die konstant aktivierte ERK, eine myokardiale Hypertrophie [39].

5.6. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie charakterisieren Signaltransduktionsschritte des α -adrenerg induzierten hypertrophen Wachstums ventrikulärer Herzmuskelzellen der Ratte.

So konnte nachgewiesen werden, dass α -Adrenozeptor induziertes hypertrophes Wachstum auf einer Aktivierung der Ca^{2+} -unabhängigen PKC-Isoformen δ und ϵ basiert.

Ein neuer Regulationsmechanismus der kardialen Proteinsynthese konnte auf Ebene der ERK identifiziert werden. Die durch α -adrenerge Stimulation ausgelöste schnelle, aber nur transiente ERK-Aktivierung ist zwar PKC-abhängig, trägt jedoch nicht zum hypertrophen Wachstum adulter Kardiomyozyten bei.

Durch gleichzeitige Hemmung der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen α und β wird die ERK ebenfalls schnell, jedoch konstitutiv aktiviert und trägt so über eine Kopplung an den α -adrenergen Proteinmetabolismus zur Steigerung der Proteinsynthese in ventrikulären Herzmuskelzellen bei.

6. Zusammenfassung

Während der Ausbildung einer myokardialen Hypertrophie aufgrund hämodynamischer Fehlbelastungen sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren entscheidend an der Steigerung der Proteinsynthese beteiligt. Zwei Mitglieder dieser Rezeptorfamilie, die unter pathophysiologisch veränderten hämodynamischen Bedingungen zum hypertrophen Wachstum des Myokards beitragen, sind der α_{1A} -adrenerge Rezeptor und der Angiotensin II Typ1 (AT1) Rezeptor. Es bestehen jedoch erhebliche Unterschiede zwischen diesen beiden Systemen bezüglich ihrer second messenger. Für die aktuellen Fragestellungen waren besonders die Unterschiede in der Präferenz einzelner PKC-Isoformen und der ERK-Abhängigkeit hinsichtlich der Proteinsynthese von Interesse.

So konnte in der aktuellen Studie gezeigt werden, dass eine α -adrenerg induzierte Hypertrophie über die Ca^{2+} -unabhängigen PKC-Isoformen δ und ϵ vermittelt wird. Diese Ergebnisse basieren auf einer pharmakologischen Hemmung verschiedener PKC-Isoformen. Verifiziert wurden diese Resultate durch selektive Down-Regulation einzelner PKC-Isoformen mit Hilfe von Antisense-Oligonukleotiden.

Weiterhin konnte ein neuer Regulationsmechanismus der α -adrenerg induzierten Proteinsynthese auf Ebene der ERK identifiziert werden. Die Überführung der ERK in ihre aktive Form erfolgt durch zweifache Phosphorylierung. Auf Immunoblots lässt sich so eine basal gelegene Bande (nicht-aktivierte ERK) von einer darüberliegenden (aktivierte ERK) getrennt darstellen. α -Agonisten führen zu einer schnellen, jedoch nur transienten Aktivierung der ERK. Unter gleichzeitiger Hemmung Ca^{2+} -abhängiger PKC-Isoformen erfolgt die Aktivierung der ERK ebenfalls schnell, in der Spätphase bleibt jedoch der Anteil aktivierter ERK weiterhin mit hoher Intensität signifikant gegenüber der alleinigen Stimulation mit Phenylephrin erhöht. Unter diesen Bedingungen erfolgt die Steigerung der α -adrenerg induzierten Proteinsynthese ERK-abhängig.

Die aktuelle Studie zeigt neue Möglichkeiten, die Entwicklung einer belastungsinduzierten Hypertrophie durch selektive Intervention effektiver zu beeinflussen als dies durch Hemmung der gesamten PKC-Aktivität erreicht wird. Solche Strategien könnten zukünftig in neuen Behandlungskonzepten der myokardialen Hypertrophie berücksichtigt werden.

7. Summary

During the induction of myocardial hypertrophy in response to acute pressure overload the participation of G-protein-coupled receptors appears to be mandatory for the acceleration of protein synthesis. Two members of this receptor family that are known to contribute to the development of myocardial hypertrophy are the α_{1A} -adrenoceptors and the Angiotensin II type 1 receptors (AT1). But there are major differences between these two systems with regard to the activation of their second messenger pathways. It was the aim of this study to investigate in more detail the relationship between PKC-isoform activation, ERK activation and acceleration of protein synthesis.

The present study shows that α -adrenoceptor induced hypertrophy is mediated via stimulation of the Ca^{2+} - independent PKC-isoforms δ and ϵ . These results are based, firstly, on pharmacological inhibition of different PKC-isoforms and, secondly, on experiments in which several PKC-isoforms are down-regulated selective by antisense-oligonucleotides.

Furthermore it was possible to identify a new regulation mechanism of α -adrenoceptor induced protein synthesis on ERK-level. By phosphorylation the ERK converts into the active form. The band with retarded gel mobility represents the phosphorylated (activated), the other band the non-phosphorylated (non-activated) form on immunoblots. Stimulation of α -adrenoceptors activates ERK in a transient manner. Inhibition of Ca^{2+} -dependent PKC-isoforms results also in a fast activation of ERK, but it prolongs the duration and efficiency significantly compared to phenylephrine alone. Under these conditions α -adrenoceptors increase protein synthesis in an ERK-dependent way.

The study opens new ways to modify myocardial hypertrophy in response to pressure overload instead of complete inhibition of all PKC activity and thus may lead to new concepts for the treatment of myocardial hypertrophy.

8. Literaturverzeichnis

- [1] Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB and Castelli WP.
Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study.
N Engl J Med 1990; 322:1561-1566.
- [2] Braunwald E
Heart Disease – A Textbook of Cardiovascular Medicine. 5.Aufl.
WB Saunders, Philadelphia 1997.
- [3] Lee YA, Lindpaintner K.
Role of the cardiac renin-angiotensin system in hypertensive cardiac hypertrophy.
Eur Heart J 1993; 14(Suppl J):42-48.
- [4] Fedida D, Braun AP, Giles WR.
Alpha 1-adrenoceptors in myocardium: functional aspects and transmembrane signaling mechanisms.
Physiol Rev 1993; 73(2):469-87.
- [5] Terzic A, Puceat M, Vassort G, Vogel SM.
Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview.
Pharmacol Rev 1993; 45(2):147-75.
- [6] Morgan HE, Baker KM.
Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural and endocrine dependence.
Circulation 1991; 83:13-25.
- [7] Sugden PH, Clerk A.
Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy.
J Mol Med 1998; 76(11):725-46.
- [8] Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hutter JF, Spieckermann PG.
Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes.
J Mol Cellh Cardiol 1982; 14:397-412.
- [9] Clark WA, Rudnick SJ, Simpson DG, LaPres JJ, Decker RS.
Cultured adult cardiac myocytes maintain protein synthesis capacity of intact adult hearts.
Am J Physiol 1993; 264:H573-H582.
- [10] Takahashi T, Schunkert H, Isoyama S, Wie JY, Nadall-Ginard B, Grossman W, Izumo S.
Age-related differences in the expression of proto-oncogenes and contractile protein genes in response to pressure overload in rat myocardium.
J Clin Invest 1992; 89:939-946.

-
- [11] Kasten FH.
Rat myocardial cells in vitro: mitosis and differentiated properties.
In vitro 1972; 8:128-150.
- [12] Schwarzfeld TA, Jacobson SL.
Isolation and development in cell culture of myocardial cells of the adult rat.
J Mol Cell Cardiol 1981; 13:563-575.
- [13] Nishizuka Y.
Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C.
Science 1992; 258:607–614.
- [14] Hug H, Sarre TF.
Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?
Biochem J 1993; 291 (Pt 2):329–343.
- [15] Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C.
The protein kinase C family.
Eur J Biochem 1992; 208:347-357.
- [16] Disatnik MH, Buraggi G, Mochly-Rosen D.
Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes.
Exp Cell Res 1994; 210:287–297.
- [17] Rybin VO, Buttrick PM, Steinberg SF.
PKC-lambda is the atypical protein kinase C isoform expressed by immature ventricle.
Am J Physiol 1997; 272:H1636-H1642.
- [18] Clerk A, Sugden PH.
Untangling the web: specific signaling from PKC isoforms to MAPK cascades.
Circ Res 2001; 89:847–849.
- [19] Mackay K, Mochly-Rosen D.
Localization, anchoring, and functions of protein kinase C isozymes in the heart.
J Mol Cell Cardiol 2001; 33:1301–1307.
- [20] Schlüter K-D, Simm A, Schäfer M, et al.
Early response kinase and PI 3-kinase activation in adult cardiomyocytes and their role in hypertrophy.
Am J Physiol 1999; 276:H1655-63.
- [21] Marshall CJ
Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation.
Cell 1995; 80:179–185.

-
- [22] Luo Z, Tzivion G, Belshaw PJ, Vavvas D, Marshall M, Avruch J.
Oligomerization activates C-Raf-1 through a ras-dependent mechanism.
Nature 1996; 383:181–185.
- [23] King AJ, Sun H, Diaz B, Barnard D, Miao W, Bagrodia S, Marshall MS.
The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338.
Nature 1998; 396:180–183.
- [24] Bogoyevitch MA, Glennon PE, Sugden PH.
Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes.
FEBS Lett 1993; 317:271–275.
- [25] Sugden PH.
Signalling pathways in cardiac myocyte hypertrophy.
Ann Med 2001; 33:611–622.
- [26] Schlüter K-D, Piper HM.
Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes.
Am J Physiol 1992; 263:H1739-46.
- [27] Schlüter K-D, Goldberg Y, Taimor G, et al.
Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation in the hypertrophic growth of adult ventricular cardiomyocytes.
Cardiovasc Res 1998; 40:171-81.
- [28] Pöncke K, Schlüter K-D, Heinroth-Hoffmann I, et al.
Noradrenaline-induced increase in protein synthesis in adult rat cardiomyocytes: involvement of only α 1A-adrenoceptors.
Arch Pharmacol 2001; 364:444-53.
- [29] Ruf S, Piper HM, Schlüter K-D.
Specific role for the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II- but not phenylephrine-induced cardiac hypertrophy in vitro.
Pflügers Arch Eur J Physiol 2000; 443:483-90.
- [30] Kant RL, McDermott PJ.
Passive load and angiotensin II evoke differential responses of gene expression and protein synthesis in cardiac myocytes.
Circ Res 1996; 78:829-38.
- [31] Ritchie RH, Marsh JD, Schiebinger RJ.
Bradykinin-stimulated protein synthesis by myocytes is dependent on the MAP kinase pathway and p70S⁶.
Am J Physiol 1999; 78:H1393-8.

-
- [32] Ueyama T, Kawashima S, Sakoda T, et al.
Requirement of activation of the extracellular signal-regulated Kinase cascade in myocardial cell hypertrophy.
J Mol Cell Cardiol 2000; 32:947-60.
- [33] Pinson A, Schlüter K-D, Zhou XJ, et al.
Alpha- and beta-adrenergic stimulation of protein synthesis in cultured adult ventricular cardiomyocytes.
J Mol Cell Cardiol 1993; 25:477-90.
- [34] Laemmli UK.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 1970; 227:680-685.
- [35] Henrick CJ, Sompson PC.
Differential acute and chronic response of protein kinase C in cultured neonatal rat heart myocytes to α 1-adrenergic and phorbol ester stimulation.
J Mol Cell Cardiol 1988; 20:1081-5.
- [36] Chen L, Hahn H, Wu G, et al.
Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC.
Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98:1114-9.
- [37] Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM, et al.
Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes.
Circ res 1996; 78:954-61.
- [38] Clerk A, Gillespie-Brown J, Fuller SJ, et al.
Stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis, protein kinase C translocation, and mitogen-activated protein kinase activity by bradykinin in rat ventricular myocytes: dissociation from the hypertrophy response.
Biochem J 1996; 317:109-18.
- [39] Takeishi Y, Ping P, Bolli R, et al.
Transgenic overexpression of constitutively active protein kinase epsilon causes concentric cardiac hypertrophy.
Circ Res 2000; 86:1218-23.
- [40] Martini-Baron GM, Kazanietz MG, Mischak H, et al.
Selective inhibition of protein kinase C isoforms by the indolocarbazole Gö6976.
J Biol Chem 1993; 268:9194-7.
- [41] Gschwendt M, Dietrich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, Johannes FJ.
Inhibition of protein kinase C by various inhibitors. Differentiation from protein kinase C isoenzymes.
FEBS Lett 1996; 392:77-80.

-
- [42] Gschwendt M, Mueller JH, Kielbassa K, et al.
Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor.
Biochem Biophys Res Commun 1994; 199:93-8.
- [43] Wilkinson SE, Parker PJ, Nixon JS.
Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C.
Biochem J 1993; 294:335-7.
- [44] Kashiwada Y, Huang L, Ballas LM, Jiang JB, Janzen WP, Lee KH.
New hexahydroxybiphenyl derivatives as inhibitors of protein kinase C.
J Med Chem 1994; 37:195-200.

9. Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Giessen, im Juni 2006

Rolf Schreckenber

10. Danksagung

Im Jahre 2002 wurde mir durch Herrn Professor Dr. Dr. H. M. Piper die Aufnahme ins DFG-Graduiertenkolleg „Biologische Grundlagen der vaskulären Medizin“ ermöglicht. Während dieser Zeit konnte ich als Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. K.-D. Schlüter sowohl meine Promotionsarbeit erstellen als auch ein umfangreiches Fachwissen über zellbiologische, molekularbiologische sowie biochemische Techniken erwerben.

Mit der Gewissheit, durch die Arbeit an ihrem Institut sowohl von der hohen fachlichen Kompetenz als auch von der sehr kollegialen und freundschaftlichen Zusammenarbeit profitiert zu haben, möchte ich mich ausdrücklich bei Herrn Professor Dr. Dr. H. M. Piper und bei Herrn Professor Dr. K.-D. Schlüter sowie bei allen Mitarbeitern des Institutes herzlich bedanken.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5116-5



9 7 8 3 8 3 5 1 9 5 1 1 6 7 ®